Sub redacţia
DUMITRU T. BUIUC

MICROBIOLOGIA PRACTICĂ

Un ghid în studiul şi practica medicinii

Ediţia a VII-a

INSTITUTUL DE MEDICINĂ ŞI FARMACIE IAŞI

Scanned with OKEN Scanner

576.8
M65

Sub redacţia
DUMITRU T. BUIUC

MICROBIOLOGIA PRACTICA

Un ghid în studiul şi practica medicinii

Autori, în ordinea alfabetică:
dr. Mircea Gh. Alexandrescu, dr. Dumitru T. Buiuc,
dr. Gabriela C. Coman, biolog Petru Gh. Gherasim,
dr. Mariana N. Luca, dr. Valeria V. Moroşanu,
dr. Viorica I. Petreanu

Ediţia a VII-a

Scanned with OKEN Scanner

PREFATA LA EDITIA A VII-a

Necesitatea reeditării ghidului de microbiologie medicală practică a fost impusă atît de epuizarea precedentei ediţii, cît şi de reorientările actuale în practica diagnosticului microbiologic, rapiditate, eficienţă, control de calitate.

In acest context, capitolele referitoare la diagnosticul microbiologic au fost restructurate pentru a sublinia tendinţa spre raţionalizarea testelor cu indicatori de eficienţă superiori în algoritmi de investigare cu moduli unitari, accesibili etapizat laboratoarelor ierarhizate, capabili a furniza cît mai rapid, cu fiecare etapă realizată, rezultate cu finalitate clinică bine conturată. Tot aici am insistat asupra aspectelor etiopatogenetice tocmai pentru a sublinia viitorului medic că nu rutina, ci ipoteza clinică este cea care ghidează ţintit investigaţia microbiologică.

Am introdus capitole noi. Aşa este cel destinat principiilor şi practicii microscopiei optice; reconsiderarea şi relansarea examenului citobacterioscopic, ca metodă rapidă de diagnostic, ca şi echiparea sălilor de lucrări cu modernele microscoape IOR, îi motivează oportunitatea. Pe această cale aduc mulţumiri colegului dr. Octavian Petrescu, şef de lucrări la Disciplina Biofizică a IMF din Iaşi, pentru prima lectură şi comentarea competentă a acestui capitol. Pentru o prezentare unitară şi economie de hîrtie, am grupat în acelaşi volum şi capitolele privind investigaţia virologică şi micologică.

Am făcut apel mai larg la schiţe şi desene destinate explicării acelor aspecte pe care le-am considerat mai dificil de intuit.

Aducem şi pe această cale omagiul nostru dascălilor care ne-au cunoscut activitatea cu ocazia precedentelor 2 ediţii ale acestei cărţi şi cu deosebita competenţă care îi caracterizează ne-au îndrumat activitatea didactică şi de cercetare în laboratorul de microbiologie clinică şi ne-au încurajat în aceste direcţii: prof.dr. Eugenia Duca, prof.dr. Mihai Duca, prof.dr.docent Grigore Teodorovici, prof.dr.docent Alla Vâţă, prof.dr.docent Matei Balş. Alese mulţumiri aducem şi tuturor celor care ne-au trimis sugestii şi aprecieri pe marginea lecturii ediţiei a VI-a.

Iaşi, 28 octombrie 1982 Dumitru T. Buiuc

Scanned with OKEN Scanner

C U P R I N S U L

	pagina
Partea I-a	
CONDITII GENERALE PENTRU STUDIUL MICROBILOR	1
1. Decontaminarea: sterilizarea, dezinfecţia, antiseptizarea, conservarea - D.T. BUIUC	3
Partea a II-a	
METODE DE DEPISTARE SI TEHNICI GENERALE PENTRU IDENTIFICAREA MICROBILOR	31
2. Microscopia optică în studiul practic al microbilor - D.T. BUIUC	33
3. Cultivarea şi studiul caracterelor fiziologice ale bacteriilor - D.T. BUIUC şi VIORICA I. PETREANU	55
4. Metode de cultivare a virusurilor, rickettsiilor şi chlamydiilor - VALERIA V. MOROSANU	69
5. Reacţiile antigen-anticorp în laboratorul de microbiologie - VALERIA V. MOROSANU	77
Partea a III-a	
DIAGNOSTICUL ETIOLOGIC AL INFECTIILOR	95
6. Diagnosticul de laborator al infecţiilor - D.T. BUIUC	97
7. Principii şi norme în recoltarea şi transportul probelor destinate examenelor microbiologice şi serologice - D.T. BUIUC şi M.GH. ALEXANDRESCU	113
8. Metode de laborator în conducerea antibioterapiei - D.T. BUIUC	127
9. Identificarea cocilor gram-pozitivi aşezaţi în grămezi - D.T. BUIUC	141
1o. Identificarea cocilor gram-pozitivi aşezaţi în lanţuri - D.T. BUIUC	145
11. Identificarea cocilor gram-negativi - GABRIELA C. COMAN	151
12. Identificarea bacililor gram-negativi aerobi sau facultativ anaerobi - D.T. BUIUC	153
13. Identificarea cocobacililor gram-negativi aerobi - D.T. BUIUC	167
14. Identificarea bacililor gram-pozitivi aerobi nesporulaţi - MARIANA N. LUCA	173
15. Identificarea bacililor gram-pozitivi sporulaţi - GABRIELA C. COMAN	177
16. Identificarea bacteriilor anaerobe nesporulate - GABRIELA C. COMAN	183
17. Identificarea bacililor acido-alcoolo-rezistenţi - VIORICA I. PETREANU	185

Scanned with OKEN Scanner

pagina

18. Identificarea spirochetelor - MARIANA N. LUCA 189

19. Identificarea principalilor fungi implicaţi în infecţii umane - P.GH. GHERASIM şi D.T. BUIUC 191

2o. Identificarea virusurilor - M.GH. ALEXANDRESCU 2o1

21. Hemocultura în diagnosticul infecţiei - D.T. BUIUC 2o3

22. Examenul microbiologic al lichidului cefalo-rahidian în diagnosticul infecţiilor sistemului nervos central - D.T. BUIUC 211

23. Examenul microbiologic al puroiului - MARIANA N. LUCA şi D.T. BUIUC 219

24. Examenul microbiologic al urinii în diagnosticul infecţiilor tractusului urinar - D.T. BUIUC 225

25. Examenul microbiologic al exsudatului nasofaringian în diagnosticul infecţiilor tractusului respirator superior - D.T. BUIUC 233

26. Examenul microbiologic al sputei în diagnosticul infecţiilor tractusului respirator inferior - D.T. BUIUC 239

27. Diagnosticul microbiologic al infecţiilor genitale la femeie - GABRIELA C. COMAN 247

28. Examenul microbiologic al materiilor fecale în diagnosticul infecţiilor gastrointestinale - D.T. BUIUC 253

29. Examenele bacteriologice în diagnosticul toxiinfecţiilor alimentare - D.T. BUIUC 261

3o. Examenele bacteriologice şi serologic în diagnosticul febrelor enterice - D.T. BUIUC 265.

31. Examenele bacteriologic şi imunologic în diagnosticul tuberculozei - VIORICA I. PETREANU şi D.T. BUIUC 267

32. Examenele bacteriologic şi serologic în diagnosticul sifilisului şi treponematozelor înrudite - D.T. BUIUC 273

33. Examenele bacteriologice şi serologic în diagnosticul leptospirozelor - D.T. BUIUC 279

34. Diagnosticul de laborator al virozelor eruptive - M.GH. ALEXANDRESCU 281

35. Diagnosticul de laborator al entero- şi neuro-virozelor - M.GH. ALEXANDRESCU 287

36. Diagnosticul de laborator al virozelor respiratorii - VALERIA V. MOROSANU 293

37. Diagnosticul de laborator al hepatitelor virale - VALERIA V. MOROSANU 299

Anexa I. Tabele rezumative privind diagnosticul de laborator în diverse infecţii (exclusiv cele tratate în capitolele 29.-37.) 3o3

Anexa II. Prepararea coloranţilor şi reactivilor necesari colorării bacteriilor. 31o

Scanned with OKEN Scanner

PARTEA I-a

CONDITII GENERALE PENTRU STUDIUL MICROBILOR

Scanned with OKEN Scanner

1. DECONTAMINAREA: STERILIZAREA, DEZINFECTIA, ANTISEPTIZAREA. CONSERVAREA

DUMITRU T. BUIUC

1.1. Aspecte generale

Contaminarea microbiană, procesul fizic prin care microbi viabili ajung pe suprafaţa unui corp sau într-o substanţă, este o permanenţă a mediului nostru de viaţă. Inmulţirea microbilor în substratul contaminat poate avea consecinţe nocive:

- infecţii şi îmbolnăviri cînd mucoasele sau ţesuturile sînt contaminate cu microbi patogeni sau cînd produse microbiene pătrund intempestiv în mediul intern prin perfuzarea unor soluţii contaminate;
- degradarea medicamentelor, alimentelor şi altor substanţe utile.

De aceea decontaminarea microbiană, procesul prin care îndepărtăm sau distrugem microbii contaminanţi, a căpătat numeroase aplicaţii în activităţile umane în general şi în cele medico-chirurgicale şi de sanitaţie în special.

1.1.1. Definiţii

Septic, în sens microbiologic, înseamnă contaminat cu microbi patogeni (obiecte, tegumente, plăgi ş.a.) ori infectat (plăgi ş.a.)

Steril, în sens microbiologic, înseamnă lipsit total de microbi viabili.

Aseptic, ca antonim pentru septic, înseamnă lipsit de microbi patogeni, dar termenul se utilizează uneori şi ca sinonim pentru steril.

Sterilizarea constă în omorîrea sau îndepărtarea tuturor microorganismelor - patogene sau nepatogene, forme vegetative şi spori - dintr-o substanţă sau de pe suprafaţa unui corp.

Dezinfecţia constă în omorîrea formelor vegetative ale microbilor în general şi ale celor patogeni în particular, dar nu obligator şi a sporilor, din substanţe sau de pe suprafeţe inerte, care astfel devin improprii pentru transmiterea infecţiei.

Scanned with OKEN Scanner

Dezinfecţia se realizează prin agenţi chimici, substanţele dezinfectante, sau fizici. Dezinfectantele, în concentraţiile lor active, sînt iritante şi toxice.

Antiseptizarea constă în omorîrea microbilor patogeni şi altor microbi în formă vegetativă de pe învelişurile organismului (tegumente, mucoase) sau din plăgi. Antiseptizarea se realizează prin agenţi chimici, substanţele antiseptice, care în dozele lor active sînt netoxice.

Conservarea constă în omorîrea sau inhibarea dezvoltării microbilor în general în medicamente, cum sînt soluţiile perfuzabile, seruri, vaccinuri, colire ş.a., în soluţii zaharoase şi în alimente. Prin conservare se previn infecţii iatrogene, infecţii transmise prin alimente ca şi degradarea microbiană a medicamentelor şi alimentelor. Metodele fizice care inhibă dezvoltarea microbilor au o serie de aplicaţii în conservarea probelor de produse patologice destinate examenelor microbiologice.

Asepsia este ansamblul metodelor prin care se evită contaminarea unui substrat al cărui status microbiologic trebuie respectat: sterilitatea ţesuturilor în cursul intervenţiilor chirurgicale; sterilitatea mediilor de cultură pentru microbi şi puritatea culturilor microbiene în studiul microbilor şi în procese microbiologice industriale; microbiota unui produs patologic; sterilitatea medicamentelor injectabile ş.a.

Acţiunea letală a unui agent antimicrobian este numită prin sufixul -cid iar cea inhibitorie prin sufixul -static adăugate la denumirea microbului sau a formei sub care acesta suferă acţiunea (bacterii, virusuri, fungi, spori). Aşa avem efecte bactericide, sporocide ş.a.; bacteriostatice ş.a.

1.1.2. Agenţii decontaminanţi sînt prezentaţi în tabelul 1-1.

1.1.2.1. Factori care influenţează acţiunea agenţilor antimicrobieni de decontaminare

(1) Intensitatea şi timpul de acţiune. Timpul de omorîre al microorganismelor variază invers proporţional cu intensitatea agentului antimicrobian. Prin urmare, scurtăm timpul de sterilizare cînd creştem temperatura; scurtăm timpul de dezinfecţie cînd creştem concentraţia dezinfectantului.

(2) Caracterele microorganismelor contaminante. Cu importanţă practică pentru aprecierea eficienţei -cide a agenţilor decontaminanţi sînt de reţinut următoarele nivele de rezistenţă ale microorganismelor pe care le redăm în ordinea lor crescătoare:

forme vegetative (bacterii, fungi) = virusuri mari şi mijlocii cu înveliş lipidic < bacilii tuberculozei < virusuri mici fără înveliş lipidic < sporii fungilor < sporii bacte-

rieni.

Exceptînd bacilii tuberculozei, între bacteriile în formă vegetativă bacilii gram-negativi sînt mai rezistenţi decît restul bacteriilor la acţiunea agenţilor -cizi cu nivel jos de eficienţă (⟶1.1.3.).

Tabelul 1-1

Agenţi decontaminanţi

Agentul şi forma de aplicare	Mecanismul de acţiune
A. Agenţi mecanici: spălare cu apă şi săpun sau alţi agenţi tensioactivi de udare şi emulsionare	îndepărtare mecanică
B. Agenţi fizici	
1. Căldura	
a. căldura uscată	oxidarea substanţei vii, eventual pînă la carbonizare
b. căldura umedă >100°C, 100°C, <100°C	degradarea enzimelor, coagularea proteinelor
2. Radiaţiile	ruperea legăturilor de H, oxidarea legăturilor duble prin H_2O_2 etc.
3. Filtrarea	reţinere mecanică + adsorbţie
C. Agenţi chimici	
Substanţe antimicrobiene	coagularea proteinelor, inactivarea enzimelor, perturbarea schimburilor de membrană

In cadrul aceleeaşi specii unele tulpini pot fi natural mai rezistente decît altele la acţiunea agenţilor antimicrobieni. Sporii majorităţii tulpinilor de Clostridium tetani şi C.perfringens sînt omorîţi în lo minute la 100°C căldură umedă, dar există tulpini ai căror spori sînt omorîţi în aceste condiţii numai după 1-3 ore. Un fenomen deosebit de periculos este însă rezistenţa dobîndită a tulpinilor unor bacterii nesporulate (enterobacterii, bacil piocianic, stafilococi) la concentraţii ale unor agenţi chimici care nu pot fi realizate în practică. Sînt afectate de acest fenomen dezinfectantele şi antisepticele cu nivel jos de eficienţă (⟶ 1.1.3).

(3) Încărcătura microbiană. Pentru aceeaşi intensitate a unui agent antimicrobian timpul de omorîre creşte odată cu numărul microbilor şi sporilor contaminanţi. De exemplu, timpul de omorîre prin căldură umedă la 121°C a sporilor se prelungeşte de la 17 minute la 23 minute cînd densitatea suspensiei creşte de la 2.10^3 la 2.10^5 spori/ml; soluţia 8% de formaldehidă omoară sporii din suspensii de ordinul a 10^3 spori/ml în 2 ore dar numai în 24 ore cînd densitatea creşte la 10^7 spori/ml.

(4) Natura obiectului şi mediul în care se realizează decontaminarea (mediul de contact). In majoritatea cazurilor apa este cea care realizează contactul intim între microbi şi agentul antimicrobian (căldura umedă, agenţi chimici ş.a.)

Bulele de aer din lumenul şi anfractuozităţile instrumentelor şi obiectelor împiedică accesul soluţiilor dezinfectante către microbii contaminanţi. Grăsimile împiedică udarea suprafeţei microbilor. De aceea grăsimile se sterilizează prin căldură uscată, iar degresarea obiectelor măreşte eficienţa sterilizantă a căldurii umede.

Porozitatea întîrzie penetrarea căldurii (mai ales a celei uscate) în masa materialului supus decontaminării.

Substanţele organice (grăsimi, proteine etc.), în afară de efectul protector direct al microbilor, inactivează agenţii chimici de decontaminare. De aceea spălarea prealabilă, prin decontaminarea mecanică a obiectelor de microbi şi substanţe organice, creşte eficienţa agenţilor de sterilizare.

Efectul microbicid al căldurii creşte în mediul alcalin sau acid şi în prezenţa substanţelor dezinfectante.

1.1.3. Nivelul de eficienţă al decontaminării

Este dictat de riscul pe care îl prezintă contaminarea microbiană într-o condiţie concretă. Practic, reţinem trei categorii de condiţii:

(1) Condiţii în care s t e r i l i z a r e a e s t e i n d i s p e n s a b i l ă (condiţii critice): toate instrumentele care penetrează învelişurile organismului şi pătrund în ţesuturi sau mediul intern (instrumente chirurgicale, seringi, catetere vasculare); toate materialele care realizează contacte cu ţesuturile sau există riscul de a-l realiza direct sau indirect (materiale de suturi, mănuşi chirurgicale, cîmpuri operatorii etc.); toate medicamentele care se injectează sau perfuzează;

Scanned with OKEN Scanner

mediile de cultură pentru microbi; toate recipientele şi instrumentarul destinate manipulării şi cultivării microbilor; toate materialele contaminate cu microbii studiaţi în laboratoarele de microbiologie.

(2) Condiţii în care s t e r i l i z a r e a e s t e d o r i t fără a fi indispensabilă (condiţii semicritice). Obiectivul urmărit, prevenirea infecţiei, poate fi realizat şi printr-o dezinfecţie eficientă: instrumentarul care vine în contact cu mucoasele (apăsătoare de limbă, componentele din material plastic şi fibră de sticlă ale endoscoapelor pentru cavităţile care comunică cu exteriorul, sonde, termometre etc.); aparatura pentru respiraţie asistată şi aspiraţie endotraheală; instrumentarul chirurgical şi seringile contaminate după utilizare; aerul sălilor de operaţie, al hotelor pentru manipulări aseptice; excretele bolnavilor infecţioşi; toate materialele contaminate cu produse patologice în laboratoarele de biochimie, hematologie ş.a.

(3) Condiţii în care dezinfecţia, antiseptizarea şi decontaminarea mecanică sînt suficiente (condiţii necritice): obiectele şi instrumentele care realizează contacte numai cu tegumentele pacienţilor (stetoscop, electrozi, mîinile personalului medical, instalaţii tehnico-sanitare, lenjerie, veselă etc.

Pornind de la aceste obiective ale decontaminării şi ţinînd cont de rezistenţa diferitelor categorii de microbi, se pot stabili trei niveluri de eficienţă microbicidă a agenţilor de decontaminate: înalt, mijlociu şi jos (→ tabelele 1-2 şi 1-3).

Tabelul 1-2

Definirea celor 3 nivele de eficienţă microbicidă ale agenţilor de decontaminare (după Spaulding şi Gröschel)

Nivelul de eficienţă	Bacterii			Fungi	Virusuri	
	Forme vegetative	Bacilii tuberculozei	Spori		Virusuri mari şi mijlocii cu înveliş lipidic	Virusuri mici fără înveliş lipidic
Înalt	+•)	+	+	+	+	+
Mijlociu	+	+	-	+	+	+
Jos	+	-	-	+	+	-

•) + = efect cid; - = lipsa efectului cid.

Tabelul 1-3

Clasificarea agenţilor de decontaminare în funcţie de nivelul eficienţei -cide (după Spaulding şi Gröschel; Schmidt, Naumann şi Horsch)

Nivelul eficienţei -cide	Agentul de decontaminare	Intensitatea (temperatură sau concentraţie)	Timpul de omorîre a microbilor[1]
INALT: agenţi de sterilizare	Căldură uscată:		
	- aer cald	180°C	25 minute
	Căldură umedă:		
	- vapori sub presiune	121°C	18 minute
		134°C	3 minute
	Agenţi chimici:		
	- oxid de etilen	450-800 mg/litru[2]	2½-3 ore
	- glutaraldehidă în soluţie alcalină	2%	2 ore
	- formaldehidă în alcool de 70°	8%	2 ore
MIJLOCIU: agenţi de dezinfecţie	Căldură umedă:		
	- fierberea	100°C	30 minute
	Agenţi chimici:		
	- clor şi derivaţi de clor	500-5000 ppm[3,4]	4-6 ore
	- lapte de var	20%	6 ore
	- derivaţi fenolici	1-3%	4-12 ore
	- formaldehidă în apă	3%	4 ore
		1,5%	12 ore
	- detergenţi amfolitici	2%	12 ore
JOS: în majoritate agenţi de antiseptizare	- alcool etilic	70°	5 minute
	- alcool + iod	70° + 2%	5 minute
	- iod soluţie apoasă	1%	5 minute
	- iodofori	75-150 ppm[3,5]	5 minute
	- detergenţi cationici	0,1-1%	2-30 minute
	- săruri anorganice de mercur	0,1-0,2%	
	- detergenţi amfolitici	2%	5 minute

1) Timpul acceptat de majoritatea autorilor în condiţii de testare corespunzătoare situaţiilor şi scopurilor medico-chirurgicale şi de sanitaţie (adică sterilizare, dezinfecţie, antiseptizare)

2) În sterilizator la 55-60°C şi 40% umiditate relativă.

3) ppm = părţi pentru un milion.

4) Clor liber (activ).

5) Iod activ.

In c o n c l u z i e, realizăm un nivel de eficienţă scontat al decontaminării numai dacă asigurăm condiţii precis controlate de acţiune a agenţilor decontaminanţi. De aceea

- căldura, a cărei acţiune o controlăm mai uşor decît pe cea a agenţilor chimici, este mai larg utilizată în practica sterilizării;
- eficienţa sterilizării trebuie testată sistematic pentru fiecare lot de materiale sterilizate;
- eficienţa dezinfectantelor şi antisepticelor cu nivel jos de eficienţă trebuie testată periodic prin antiseptograma*) unor loturi reprezentative de tulpini microbiene recent izolate din spitalele în care aceste substanţe se aplică.

1.2. Metode de sterilizare

1.2.1. Sterilizarea prin căldură este cel mai larg folosită în practica medicală.

1.2.1.1. Sterilizarea prin căldură uscată

1.2.1.1.1. Sterilizarea prin ardere în flacără este rapidă şi cu eficienţă absolută. Indicaţii: obiecte cu volum mic, care nu se degradează, se răcesc repede şi se întrebuinţează imediat după sterilizare.

Incălzirea la roşu: obiectul de sterilizat se arde în flacără (bec de gaz, lampă de spirt) pînă la roşu. Indicată pentru: firul, ansa şi spatula de platină (fig. 1-1).

Flambarea: obiectul de sterilizat se trece prin flacără timp de cîteva secunde. Indicată pentru: capilarul pipetelor Pasteur, gura eprubetelor şi flacoanelor (sterile în interior), lame de sticlă, tija port-ansă, -spatulă etc. (fig.1-1).

Aceste metode sînt contraindicate pentru sterilizarea altor instrumente metalice (ace de seringă din oţel, bisturie, foarfece, pense ş.a.) deoarece le degradează.

Prin incinerare se pot steriliza reziduurile contaminate (pansamente, comprese, gunoiul menajer).

1.2.1.1.2. Sterilizarea prin aer cald. Indicaţii: obiecte de sticlă (eprubete, flacoane, cutii Petri, pipete etc.), de porţelan

*) Antiseptograma este metoda prin care se testează sensibilitatea microbilor la antiseptice şi dezinfectante.

(mojare, capsule), instrumentarul chirurgical metalic, seringile în întregime din sticlă (tip Luer), unele pulberi, substanţe grase.

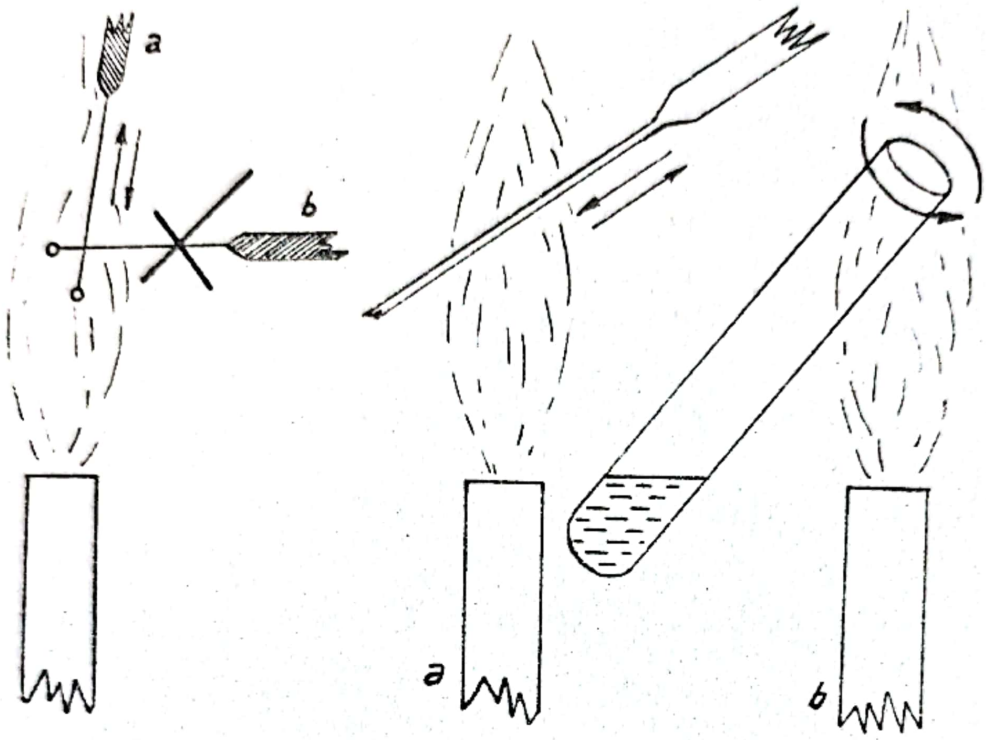


Fig.1-1 Stînga, sterilizarea ansei prin ardere la roşu: a - poziţia corectă, b - poziţie incorectă. Dreapta, sterilizarea prin flambare: a - capilarul pipetei Pasteur, b - gura eprubetei.

Contraindicaţii: soluţii apoase, obiecte din cauciuc sau cu garnituri de cauciuc, ţesături şi fibre de bumbac, seringile din metal şi sticlă (tip Record), materialul contaminat din laborator (degradează aceste materiale).

Sterilizarea prin aer cald se realizează în Pupinel la 180°C timp de 1 oră. Timpul de sterilizare la Pupinel creşte peste 1 oră în cazul ambalajelor voluminoase sau a obiectelor şi substanţelor care se încălzesc greu (→ tabelul 1-4)

Sterilizatorul cu aer cald (Pupinel) este o cutie, cilindrică sau paralelipipedică, cu pereţi dubli de tablă. Rezistenţe electrice, plasate la partea inferioară a aparatului, şi un termostat permit obţinerea şi menţinerea temperaturii de sterilizare. Un sistem de ventilaţie permite circularea aerului cald în interiorul aparatului pentru uniformizarea temperaturii. În interior se găsesc rafturi de sită metalică pe care se aşează obiectele de sterilizat (fig. 1-2).

Funcţionare: obiectele pregătite pentru sterilizare se aşea-

ză pe rafturile aparatului, fără a-l umple la refuz şi cu precauţia de a lăsa între obiecte mici spaţii care să permită circulaţia nestînjenită a aerului cald. Se închide uşa aparatului, se deschide orificiul de ventilaţie, se face contactul electric şi se reglează pentru temperatura de 180°C. Din momentul în care se atinge această temperatură, se marchează timpul. După o oră se întrerupe curentul. Obiectele sterilizate se scot numai după răcirea aparatului.

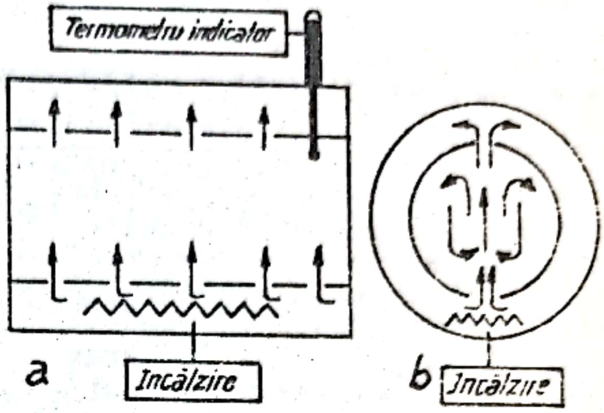


Fig. 1-2 Prezentare schematică a unui sterilizator cilindric cu aer cald. Circulaţia aerului cald.
a - secţiune longitudinală,
b - secţiune transversală.

1.2.1.2. Sterilizarea prin căldură umedă

1.2.1.2.1. Sterilizarea prin vapori sub presiune

Sterilizarea prin vapori sub presiune se realizează în autoclave la 1 atmosferă (121°C) sau 2 atmosfere (134°C). Pentru o presiune dată, durata sterilizării la autoclav - timpul de autoclavare - creşte direct proporţional cu volumul materialului de sterilizat. In general menţinerea la 121°C (1 atmosferă) timp de 45-5o minute a lenjeriei chirurgicale ambalate în casolete şi timp de 3o minute a soluţiilor în volume de 5oo-1ooo ml asigură sterilitatea (⟶ tabelul 1-4).

Indicaţii: obiecte din bumbac (lenjerie chirurgicală, tampoane, meşe ş.a.); instrumentarul chirurgical metalic; instrumentar, aparate şi dispozitive din sticlă cu armături metalice, garnituri şi părţi din cauciuc (seringi Record, aparate de filtrare ş.a.); obiecte şi instrumente din cauciuc (mănuşi chirurgicale, sonde ş.a.); sticlăria de laborator destinată pentru culturi de celule); soluţii; materialul contaminat din laborator.

Tabelul 1-4 prezintă, comparativ, parametrii sterilizării prin aer cald şi prin vapori sub presiune. De remarcat că sterilizarea la autoclav se realizează la temperaturi mai reduse şi într-un timp mai scurt decît la Pupinel. Aceasta ţine de mecanismul diferit de acţiune al căldurii umede şi uscate (⟶ tabelul 1-1) şi de încălzirea mai rapidă a obiectelor în autoclav (propagarea căldurii prin convecţie) decît în Pupinel (propagarea căl-

Tabelul 1-4

Prezentare comparativă a parametrilor sterilizării prin aer cald şi vapori de apă sub presiune (adaptat după Schmidt, Naumann şi Horsch)

Materialul şi volumul în care este supus sterilizării	Timpul*) de egalizare a temperaturii	Timpul*) de omorîre a microbilor	Timpul*) total al operaţiei**)
Sterilizare la Pupinel la 180°C			
Sticlărie, instrumentar metalic în ambalaje cu volum redus	35	25	6o
Ibid. în ambalaje voluminoase; seringi Luer ambalate în tuburi; pulberi (în cutii Petri în strat mai subţire de o,5 cm şi nu mai mult de lo g/cutie)	65-95	25	9o-12o
Ulei de arahide (maximum 85% din volumul recipientului):			
. în fiole pînă la 2o ml	25	25	5o
. în flacoane de loo ml	45	25	7o
. în flacoane de 3oo ml	5o	25	75
Sterilizare la 121°C (1 atmosferă)			
- în autoclav vertical cu perete simplu			
Soluţii apoase (maximum 75-8o% din volumul recipientului):			
. vol.de lo ml în eprubete	o	18	18
. vol.de 5oo ml	2-7	18	2o-25
. vol.de looo ml	7-12	18	25-3o
. vol.de 2ooo ml	17-27	18	35-45
- în autoclav vertical cu manta de abur			
Instrumentar împachetat în hîrtie sau în containere metalice întredeschise	12	18	3o
Casolete cu lenjerie chirurgicală (fără a fi îndesată)	27	18	45
Sterilizare la 134°C (2 atmosfere)			
- în autoclav orizontal cu prevacuum			
Casolete cu lenjerie chirurgicală (chiar îndesată)	1	3	4

*) Timpul măsurat în minute

**) Măsurat din momentul în care temperatura camerei de sterilizare a atins temperatura selectată. Deci, pentru a obţine un material steril în stare de utilizare, la timpii consideraţi în tabel mai trebuie adăugat timpul de încălzire al aparatului, timpul de răcire şi, pentru autoclave, timpul de uscare a materialelor.

durii numai prin conductibilitate şi radiaţie).

> Pentru sterilizarea la Pupinel sau autoclave se constituie loturi de materiale cu timp de sterilizare asemănător.
>
> Timpul de uniformizare a temperaturii variază direct proporţional cu volumul materialelor supuse sterilizării.
> Timpul de omorîre al microbilor variază invers proporţional cu temperatura de sterilizare.

Autoclavul are ca piesă principală un cazan cu pereţi rezistenţi în interiorul căruia, după închiderea etanşă cu un capac masiv, prevăzut cu buloane sau sistem cabestan, vaporii de apă se pot comprima la presiunea necesară sterilizării.

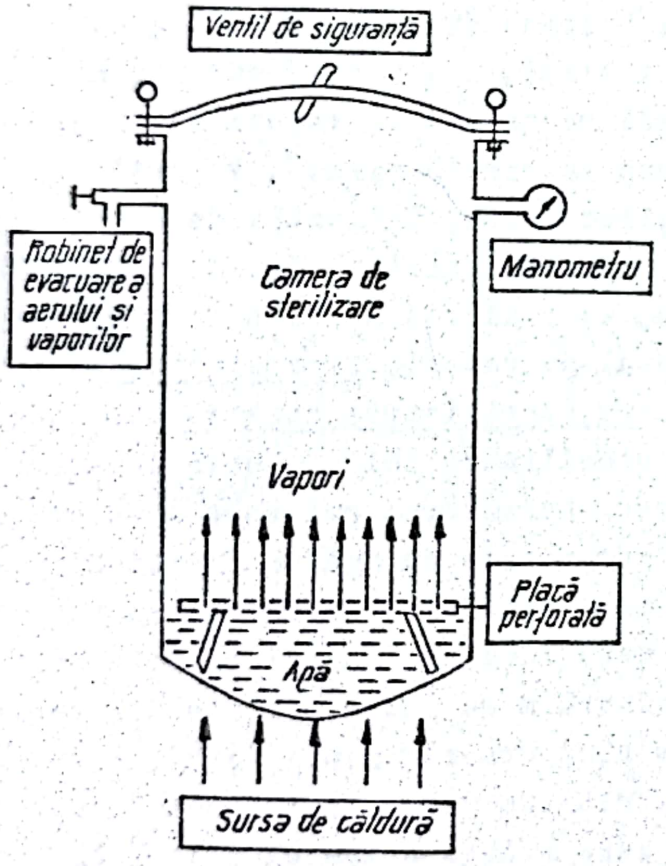


Fig. 1-3 Secţiune schematică simplificată printr-un autoclav cu perete simplu, aparat indicat pentru sterilizări în laboratoare şi farmacii.

Autoclavele verticale au axul lung al cazanului de presiune dispus vertical. Autoclavul vertical cu perete simplu (→ fig.1-3) se utilizează pentru sterilizarea soluţiilor şi a materialului contaminat din laboratoare. De regulă nu se foloseşte pentru sterilizarea materialelor chirurgicale deoarece nu le asigură o uscare eficientă după sterilizare.

La acest tip de autoclav vaporii provin din încălzirea apei aflată în cazanul de presiune şi pătrund în camera de sterilizare de jos în sus. Un manometru permite controlul presiunii din interiorul cazanului. Un robinet de vapori, aflat în partea superioară a autoclavului, pune în legătură cazanul cu exteriorul. Un al doilea

robinet aflat la partea inferioară a autoclavului permite evacuarea apei din cazan. O supapă de siguranţă asigură evacuarea vaporilor cînd presiunea lor depăşeşte o anumită limită de securitate. In interiorul cazanului se află un trepied metalic care serveşte ca suport materialelor introduse pentru sterilizare într-un coş de sîrmă. Cazanul este cuprins într-un manşon de tablă groasă, care la partea inferioară formează un lăcaş pentru adaptarea sursei de căldură.

Funcţionarea. Se introduce în cazanul autoclavului apă pînă la 2-3 cm sub nivelul suportului. Se aşează pe suport coşul de sîrmă cu eprubetele sau flacoanele de sterilizat acoperite cu o hîrtie pentru ca dopurile de bumbac să nu fie înmuiate de apa provenită de la condensarea vaporilor pe capacul autoclavului. Se închide capacul cu ajutorul buloanelor care se strîng două cîte două, diametral opus, în doi timpi, mai întîi uşor, cu mîna, apoi complet cu cheia. Se deschide robinetul de vapori şi se conectează sursa de căldură. Cînd apa începe să fiarbă, vaporii ies prin robinet la început în jet discontinuu, întrerupt de aerul care este evacuat concomitent din aparat, apoi în jet continuu. Cînd vaporii ies în jet continuu, semn că tot aerul a fost evacuat din autoclav, se închide robinetul de vapori. Evacuarea aerului din autoclav este esenţială pentru sterilizarea corectă: în pungile de aer rămase în camera de sterilizare căldura este insuficientă pentru a realiza sterilizarea. Aprecierea mai corectă a evacuării aerului se face cufundînd într-un vas cu apă un furtun adaptat la robinetul de vapori. Aerul este complet evacuat din incinta de sterilizare în momentul în care încetează a mai barbota prin apă. Se notează timpul necesar pentru a se putea aprecia mai corect la sterilizările ulterioare cînd urmărim numai jetul de vapori.

După închiderea robinetului de vapori presiunea începe să crească şi din momentul în care atinge valoarea aleasă (1 sau 2 atmosfere), se reglează sursa de căldură pentru a menţine presiunea la acest nivel pe durata indicată (⟶ tabelul 1-4). La epuizarea timpului de sterilizare, se întrerupe sursa de căldură. Autoclavul se deschide numai după ce presiunea a coborît la zero şi înainte de a se răci. Se deschide capacul, se lasă 10-15 minute pentru uscarea hîrtiei protectoare şi a dopurilor de bumbac (în acest timp vaporii care se degajă de pe materialele fierbinţi împiedică pulberile din aer să se depună şi să contamineze dopurile), se scot materialele.

Scanned with OKEN Scanner

Dacă la acest tip de autoclav se deschide robinetul de vapori înainte ca presiunea să fi coborît la zero, temperatura din interior fiind încă peste 100°C, lichidele intră brusc în fierbere, udă dopurile sau chiar ies din recipiente. Dacă se întîrzie deschiderea aparatului, vaporii de apă se condensează şi udă materialele sterilizate şi răcite iar în autoclav se creează vid. Capacul va putea fi deschis numai după ruperea vidului prin robinetul de vapori, dar astfel în autoclav pătrunde aerul atmosferic care contaminează, prin pulberile pe care le vehiculează, hîrtia protectoare şi dopurile de bumbac ude şi reci. Aceasta compromite sterilizarea: hîrtia şi dopurile de bumbac umede nu previn pătrunderea microbilor de contaminare. Aşadar este esenţial ca obiectele ambalate în hîrtie să nu vină în contact, după sterilizarea la autoclav, cu pulberile din aer şi cu suprafeţe contaminate atît timp cît dopurile şi ambalajul lor nu sînt perfect uscate.

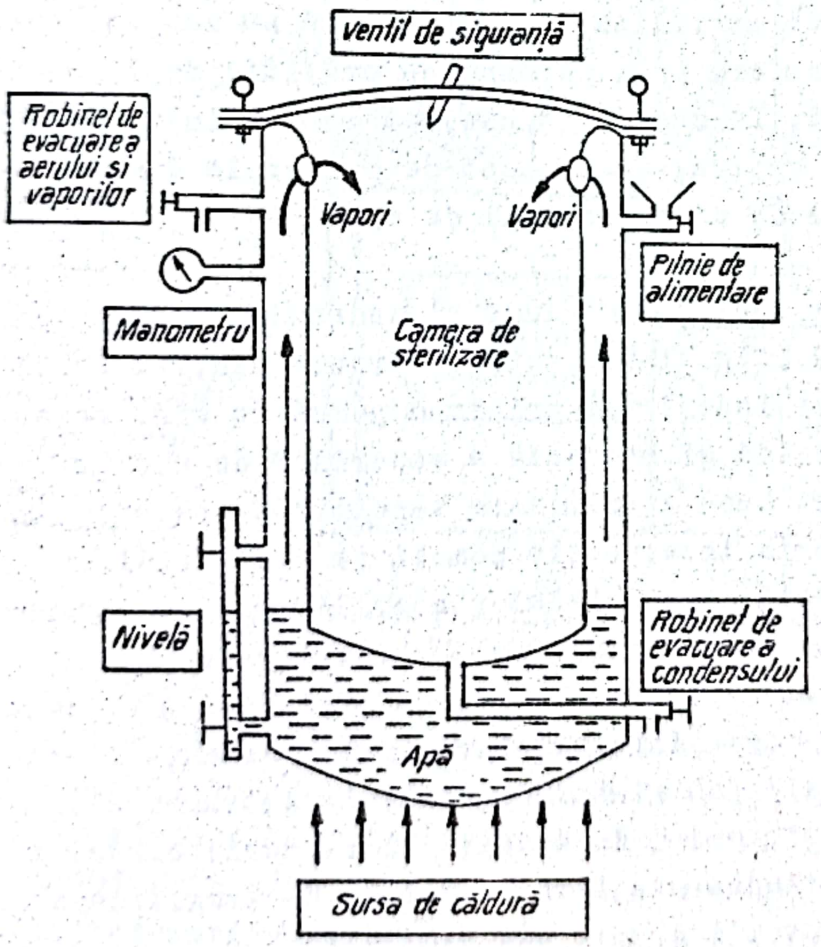


Fig. 1-4 Secţiune schematică simplificată printr-un autoclav vertical cu manta de abur, aparat indicat pentru sterilizarea materialului chirurgical

<u>Autoclavul vertical cu manta de abur</u> asigură prin construcţie şi mod de funcţionare uscarea mai rapidă şi completă a materialelor sterilizate. De aceea este indicat pentru sterilizarea materialelor chirurgicale.

La acest tip de autoclav vaporii de apă provin dintr-o sursă plasată la partea inferioară a cazanului de presiune şi pătrund în camera de sterilizare de sus în jos după ce au trecut prin mantaua de abur şi au încălzit-o (fig. 1-4). La autoclavul vertical cu manta de abur gă-

sim următoarele accesorii în plus faţă de autoclavul cu perete simplu: o pîlnie şi o nivelă prin care se controlează apa din sursa de vapori, robinetele care pun în comunicare sursa de vapori cu aceste piese, un robinet prin care se elimină apa de condens acumulată în partea declivă a camerei de sterilizare.

Funcţionarea. Se introduce apă în cazan pînă la marca indicată pe nivelă. Se închid robinetele nivelei şi pîlniei de alimentare. In continuare se procedează ca şi la autoclavul cu perete simplu pînă la epuizarea timpului de sterilizare. Se deschide robinetul de vapori (reamintim că acest autoclav nu este destinat sterilizării soluţiilor). Cînd, ca urmare a evacuării vaporilor, presiunea în autoclav scade pînă la o,5 atmosfere, se deschide robinetul pentru evacuarea condensului din camera de sterilizare, iar cînd presiunea scade la zero se deschide capacul autoclavului. In acest moment autoclavul are peste 100°C, apa fierbe în rezervor, vaporii în drumul lor prin mantaua de abur menţin la >100°C temperatura camerei de sterilizare în care însă nu mai au acces ci se elimină în atmosferă prin coroana de orificii de la partea superioară a mantalei. In acest mod uscarea materialului sterilizat este completă şi rapidă, la adăpost de pulberile din aer care sînt antrenate în sus de către vaporii de apă.

La autoclavul orizontal axul lung al cazanului de presiune este dispus orizontal (fig. 1-5). Vaporii provin dintr-o sursă separată, iar aerul este îndepărtat printr-o pompă de vid. Aceasta asigură penetraţia rapidă şi perfectă a vaporilor de apă în porozităţile materialelor. După sterilizare vaporii de apă sînt îndepărtaţi de asemenea prin intervenţia pompei de vid. Vidul creat asigură uscarea perfectă a materialelor sterilizate. Pentru ruperea vidului, după uscarea materialelor, aparatul este prevăzut cu un filtru de aer. Autoclavele orizontale cu prevacuum sînt indicate pentru sterilizarea inventarului chirurgical. Absenţa aerului în timpul încălzirii elimină riscul degradării instrumentelor metalice sub acţiunea oxigenului în condiţiile căldurii umede. Aceste autoclave sînt destinate staţiilor centrale de sterilizare din spitale, blocuri operatorii ş.a.

1.2.1.2.2. Tyndallizarea sau sterilizarea fracţionată evită încălzirea la temperaturi peste 100°C. Tyndallizarea se efectuează în autoclavul cu robinetul de vapori deschis (100°C) sau la baia de

apă ($\leqslant 100^{o}C$). Indicaţii: sterilizarea substanţelor termolabile (medii de cultură pentru microbi, unele alimente şi medicamente).

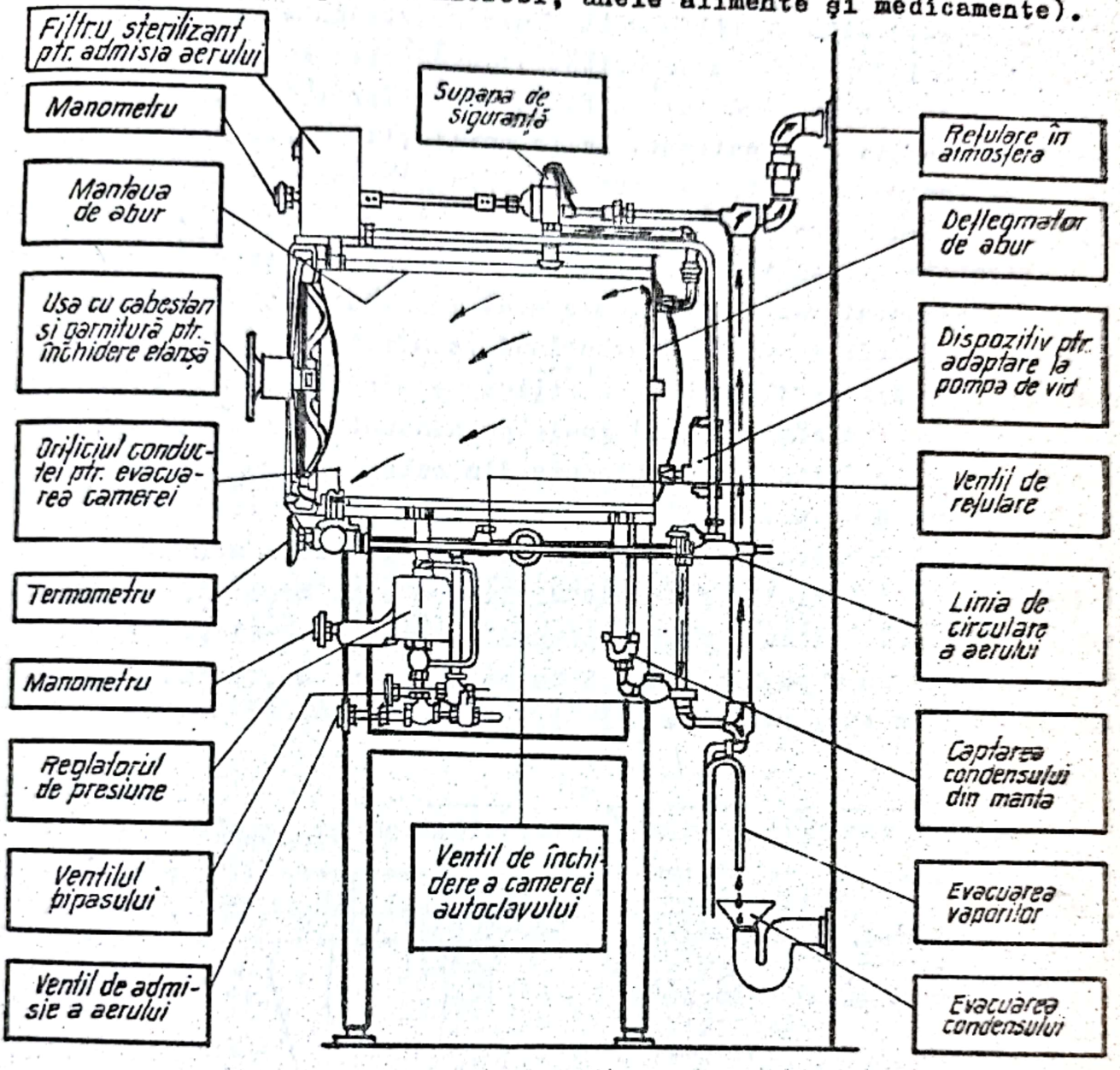


Fig. 1-5 Secţiune schematică printr-un autoclav orizontal cu manta de abur şi prevacuum

Substanţele de sterilizat se menţin timp de 3o-6o minute*) 8-3 zile succesiv la temperatura impusă de compoziţia lor ($56^{o}C$-$100^{o}C$) In intervalele dintre încălziri recipientele cu substanţele supuse sterilizării sînt menţinute la temperatura camerei (2o-$25^{o}C$). Formele vegetative germinate din sporii eventual prezenţi vor fi distruse la a doua, la a treia încălzire ş.a. 447.587

*) Pentru volumele mai mari de 1 litru acest timp se prelungeşte peste 1 oră ţinînd cont de intervalul necesar uniformizării temperaturii. Asemenea situaţii sînt însă de evitat.

Scanned with OKEN Scanner

1.2.2. Sterilizarea prin filtrare

Filtrarea este trecerea unui fluid printr-un corp poros (filtru). Utilizînd filtre cu porozităţi convenabile se poate obţine debarasarea de microorganisme a fluidului filtrat, acestea fiind reţinute mecanic şi electrostatic în porii filtrului. Metoda este indicată pentru sterilizarea aerului şi a lichidelor (medii de cultură pentru microbi, medicamente) care nu suportă încălziri.

Filtrele sterilizante utilizate în bacteriologie diferă după natura substanţei poroase din care sînt fabricate, după mărimea porilor şi formă: filtrele Chamberland (confecţionate din porţelan) şi filtrele Berckefeld (confecţionate din pămînt de infuzorii) au forma unor lumînări (bujii) goale pe dinăuntru şi închise la un capăt. Filtrele Seitz (confecţionate din azbest impregnat cu caolin) au forma unor plăci filtrante. Filtrele Schott (confecţionate din sticlă poroasă) au forma unor plăci filtrante montate într-o pîlnie de sticlă. Filtrele Millipore sînt membrane din acetat de celuloză. Fiecare filtru poartă un indicator al porozităţii. Filtrele cu Ø porilor de o,5 µm reţin toate bacteriile. Virusurile mici nu sînt reţinute prin filtre.

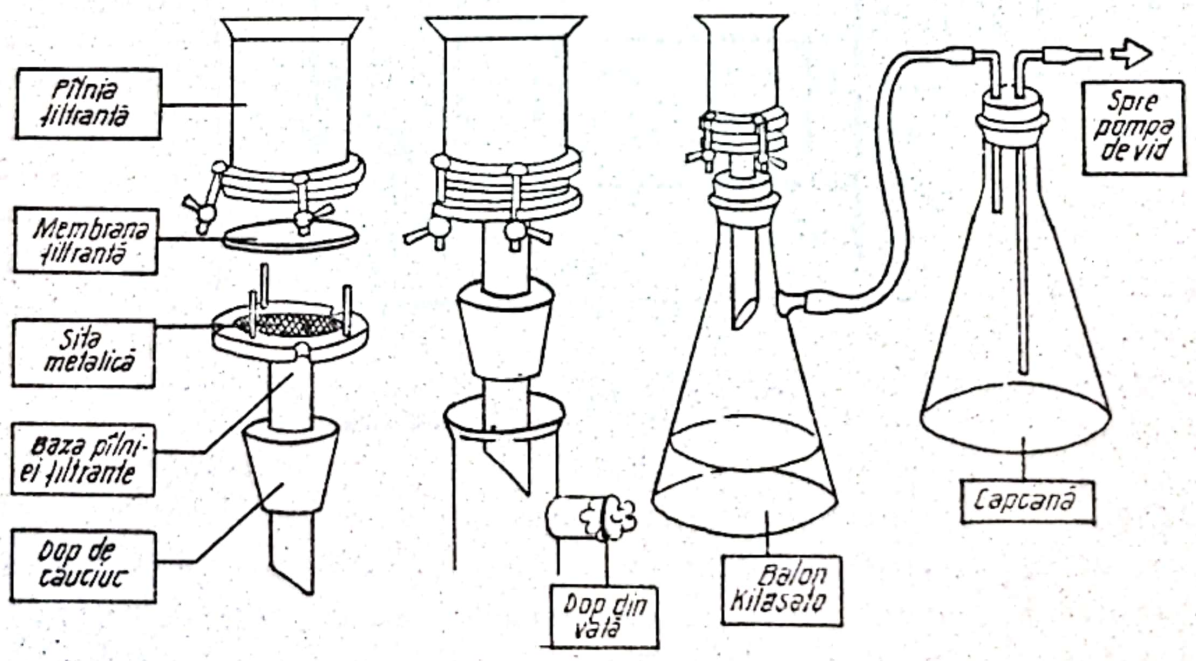


Fig. 1-6 Filtru Seitz adaptat la dispozitiv de filtrare prin presiune negativă

Filtrarea se face prin aspiraţie sau prin presiune pozitivă.

In acest scop filtrele sînt adaptate la diferite dispozitive de filtrare (fig. 1-6). Înainte de folosire, filtrul gata montat la recipientul de colectare a lichidului este sterilizat prin autoclavare sau prin oxid de etilen (în funcţie de tipul filtrului).

1.2.3. Sterilizarea prin radiaţii

Razele gama se utilizează pentru sterilizarea industrială a instrumentarului medical dispozabil (seringi, flacoane ş.a.), a unor medicamente, alimente ş.a.

1.2.4. Sterilizarea chimică (→ tabelul 1-3) are întrebuinţări limitate.

1.2.5. Controlul eficienţei sterilizării

Se face prin indicatori fizici, chimici şi biologici.

● Indicatori fizici: manometru, termometru, termograf şi higrograf.

● Indicatori chimici: → tabelul 1-5.

Tabelul 1-5

Substanţe folosite ca indicatori chimici pentru sterilizare

La autoclav		La Pupinel	
Substanţa	Punct de fuziune	Substanţa	Punct de fuziune
Floare de sulf	115°C		
1,3,5-tribrom-fenol	120°C	Thiouree	180°C
Acid benzoic	121-122°C	Sulfametoxi-piridazină	180-182°C
Fenacetină	134°C		

Dezavantajul indicatorilor fizici şi chimici: exceptînd termografele, nu dau indicaţii asupra timpului cît s-a menţinut temperatura.

● Indicatorii biologici , tuburi conţinînd fire de bumbac impregnate cu spori bacterieni şi uscate, au o mare fidelitate. După sterilizare se testează viabilitatea sporilor prin însămînţarea lor în medii de cultură adecvate. Sînt utilizaţi pentru controlul sterilizărilor prin căldură şi prin oxid de etilen.

Tuburi cu indicatori chimici sau biologici se plasează la diferite nivele ale camerei de sterilizare.

Scanned with OKEN Scanner

Controlul sterilităţii substanţelor sau obiectelor se face prin însămînţare în condiţii aerobe şi anaerobe de incubare. Mediile de cultură utilizate în acest scop sînt livrate de Institutul Cantacuzino din Bucureşti împreună cu instrucţiunile pentru folosire.

1.2.6. Pregătirea materialelor pentru sterilizare

Dezinfecţia, curăţirea şi spălarea. Atît materialele de laborator (sticlărie ş.a.) cît şi instrumentarul şi materialele chirurgicale, seringi ş.a. înainte de sterilizare trebuie perfect curăţate prin spălare. Instrumentarul şi recipientele contaminate cu sînge, chiar dacă acesta provine de la o persoană aparent normală, expune personalul la riscul hepatitei virale. Materialele contaminate după utilizare se dezinfectează înainte de spălare.

Sticlăria de laborator colectată în găleţi speciale pentru material contaminat se sterilizează la autoclav, 1 oră la 134°C, pipetele sînt menţinute 24 ore în amestec sulfo-cromic.

Instrumentarul metalic, seringile şi acele contaminate cu sînge, puroi sau alte exsudate se decontaminează după cum urmează:

- scufundare 15-3o minute în baie cu soluţie de amoniac 1% pentru îndepărtarea sîngelui din anfractuozităţile unde periajul este mai puţin eficient. Obligator, în final, baia de amoniac va fi dezinfectată (adăugare de cloramină 5% în concentraţia finală, timp de contact 4 ore). Pe tot parcursul operaţiei personalul va purta mănuşi de cauciuc, halat de protecţie şi va evita formarea de aerosoli virtual contaminanţi (fig. 1-7).

- dezinfecţie cu un agent chimic puţin afectat de prezenţa substanţelor organice: un compus de fenol (lyzol 3%, contact 1-2 ore) sau glutaraldehidă 2% (contact 15-3o minute) sau fierbere 3o minute în apă cu 2% carbonat de sodiu;

- periaj în soluţie 1-2% detergent (Dero, Perlan) în apă caldă; pentru curăţirea acelor se va utiliza mandrenul;

- spălare la jet abundent de apă pentru îndepărtarea urmelor de substanţe chimice.

1.2.7. Prezervarea sterilităţii materialelor

Se face prin diferite procedee care se aleg în funcţie de natura materialului şi metoda de sterilizare.

Eprubetele şi flacoanele, la care ne interesează păstrarea sterilităţii suprafeţei interne şi a conţinutului, se pun la ste-

rilizat prevăzute cu dopuri de vată şi tifon, protejate cu capişon de hîrtie sau foiţă de aluminiu.

Tuburile pentru pipete Pasteur se sterilizează cu extremităţile înfundate cu vată (fig.1-8). Pipetele gradate se sterilizează cu filtru de vată la extremitatea care se introduce în gură şi învelite individual în benzi de hîrtie sau grupate în tuburi de tablă inoxidabilă cu capac.

Plăcile Petri se sterilizează învelite individual sau grupate în hîrtie. Mojarele şi pistilele lor se învelesc separat în hîrtie.

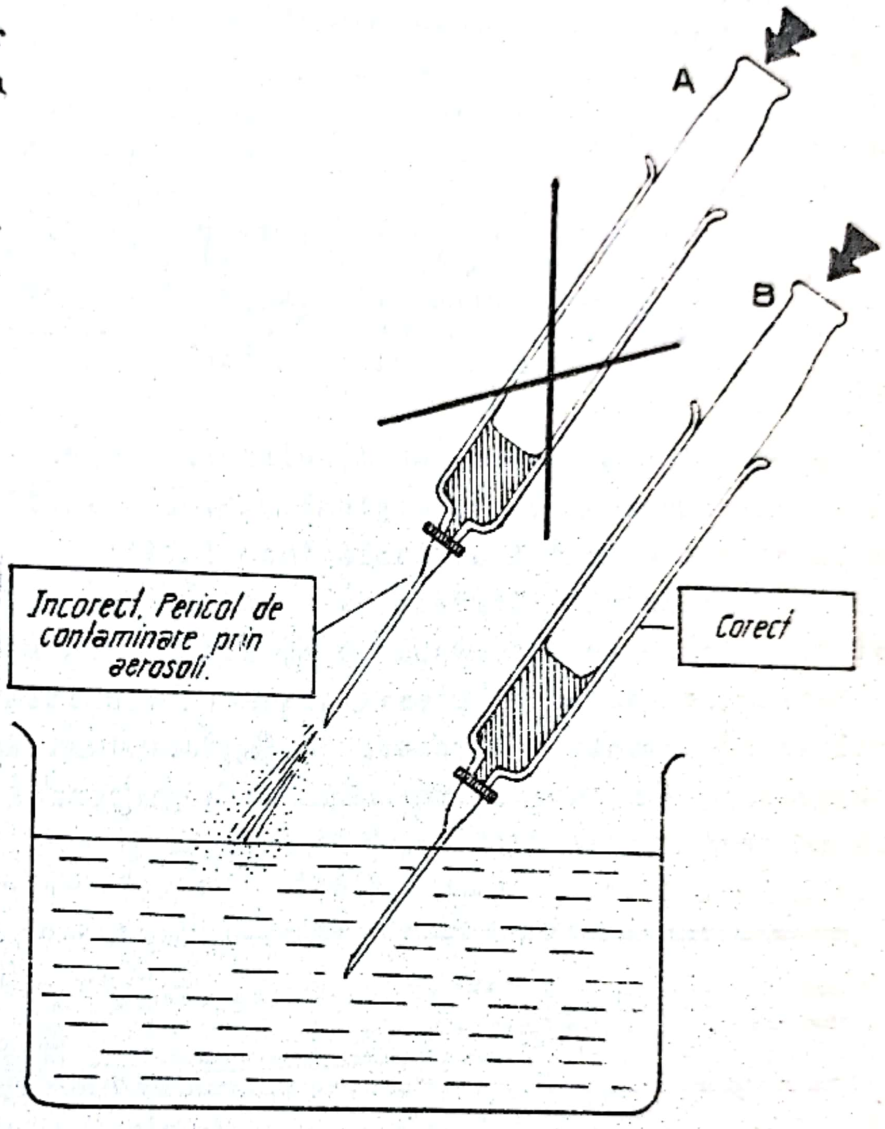


Fig.1-7 Spălarea seringii pentru îndepărtarea urmelor de sînge

Umezirea ambalajelor de hîrtie, a dopurilor şi filtrelor de vată compromite sterilitatea. Sporii fungici, omiprezenţi în pulberile de contaminare a dopurilor şi ambalajelor ulterioară sterilizării, germinează în condiţii de umezeală iar hifele lor se dezvoltă în profunzime, pătrund şi eliberează spori care contaminează interiorul flacoanelor şi ambalajelor. In ambalaje şi dopuri uscate sporii fungici nu germinează iar fungii nu se dezvoltă.

Instrumentele chirurgicale metalice se sterilizează la Pupinel în casolete speciale.

Sondele de cauciuc, material plastic ş.a. se sterilizează

în casolete speciale ale căror orificii se obturează la scoaterea lor din sterilizatorul cu oxid de etilen.

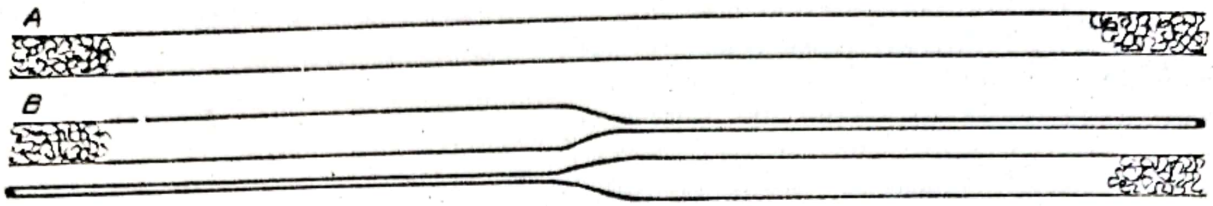


Fig. 1-8 Pipetele capilare Pasteur se obţin prin efilarea porţiunii mijlocii a unui tub de sticlă încălzită în flacără pînă la înmuierea sticlei. A- tubul pregătit în vederea sterilizării. B- Cele 2 pipete capilare obţinute dintr-un tub

Imbrăcămintea chirurgicală, cîmpurile operatorii, tampoanele, meşele, instrumentarul chirurgical ş.a. se sterilizează la autoclav în casolete (cutii de tablă inoxidabilă prevăzute cu capac şi orificii care permit pătrunderea vaporilor de apă în cursul autoclavării şi care se obturează la scoaterea din autoclav).

Seringile Record se sterilizează în casolete la autoclav. Se sterilizează demontate, fiecare seringă alături de pistonul ei în cutie proprie pentru a evita schimbarea pistoanelor între seringi. Acele se sterilizează alături de seringă, în aceeaşi cutie.

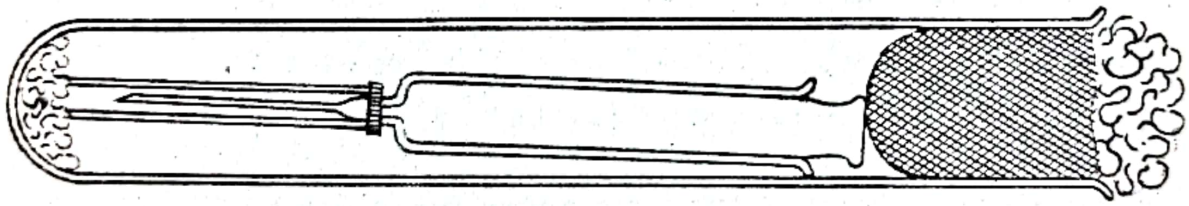


Fig. 1-9 Seringă Luer pregătită pentru sterilizarea la Pupinel

Seringile Luer se sterilizează montate şi împachetate în celofan sau hîrtie. Acele se sterilizează introduse în tuburi de sticlă de mărime corespunzătoare şi învelite individual sau grupate în celofan. Pentru destinaţii speciale (hemocultură) seringile Luer se sterilizează cu acul montat şi introduse într-un tub de sticlă astupat cu dop de vată (fig. 1-9).

După sterilizare, toate ambalajele (pachete, cutii, casolete) sînt sigilate iar pe sigiliu se notează: „Sterilizat la data de... nr. lotului de sterilizare (conform registrului de evidenţă).

Scanned with OKEN Scanner

1.3. Dezinfecţia şi antiseptizarea

Prin importanţa lor dezinfecţia şi antiseptizarea depăşesc mult sfera laboratorului de microbiologie avînd largă aplicaţie în practica epidemiologică, igiena comunală şi de spital, a locuinţei şi personală, în chirurgie. Aici vom insista numai asupra aspectelor legate de activităţile în laboratorul de microbiologie. Asupra aspectelor proprii celorlalte domenii de aplicare se va reveni pe larg în cursul stagiilor clinice şi de epidemiologie, a lucrărilor practice de igienă. Aspecte legate de antiseptizarea tegumentelor şi mucoaselor sînt tratate pe larg în alte capitole (→ 21-24).

1.3.1. Dezinfecţia prin căldură

Dezinfecţia prin aer cald şi prin vapori de apă vor fi abordate în cursul stagiilor de epidemiologie.

1.3.1.1. Dezinfecţia prin fierbere

Indicaţii: instrumentarul chirurgical şi seringile contaminate după utilizare; seringi şi instrumentar de mică chirurgie în urgenţe cînd nu dispunem de posibilităţi pentru sterilizare; alimente; apa de băut cînd există riscul infecţiilor cu transmitere hidrică; lenjerie.

Fierbătorul destinat seringilor Record şi instrumentarului de mică chirurgie în situaţii de urgenţă este o cutie alungită din tablă inoxidabilă sau emailată prevăzută cu un grătar detaşabil în condiţii aseptice la terminarea operaţiei (fig.1-1o).

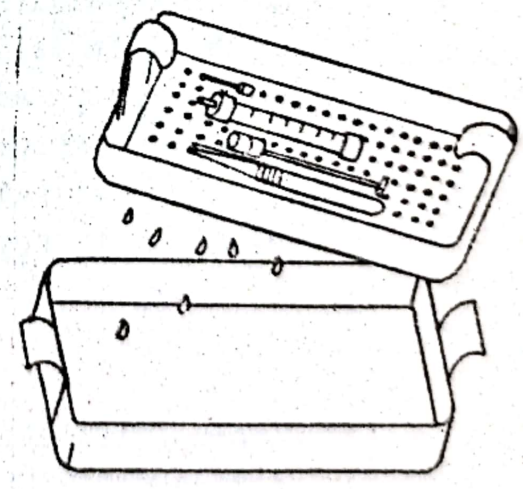


Fig.1-1o Fierbătorul

Fierberea timp de 3o minute distruge toate bacteriile în formă vegetativă, fungii şi virusurile, dar nu distruge unii spori bacterieni. Dacă apa este dură, pentru a evita depunerea unei pelicule de calcar pe instrumente, fierberea se face în apă distilată sau deionizată. Timpul se marchează din momentul în care apa începe să fiarbă. Este esenţial

Scanned with OKEN Scanner

ca în intervalul celor 3o minute să nu se mai introducă nici un alt obiect în fierbător. La sfîrşit se ridică grătarul cu seringi folosind în acest scop cîrlige anume destinate şi dezinfectate chimic sau prin flambare. Se scurge apa din fierbător. Se pune la loc grătarul. Instrumentele şi seringile fierbinţi se usucă în scurt timp. Dacă seringa udă este luată în mînă, microbii de pe degete, prin pelicula de lichid, pot contamina o suprafaţă întinsă, eventual chiar amboul, acul şi pistonul.

Adăugarea la apă a carbonatului de sodiu în concentraţie de 1-2% măreşte eficienţa antimicrobiană a fierberii.

1.3.2. Dezinfecţia prin radiaţii. Radiaţiile ultraviolete cu lungime de undă de 24o-28o nm furnizate de lămpi cu mercur sînt folosite pentru dezinfecţia aerului şi a suprafeţelor de lucru în hotele şi boxele pentru lucru aseptic, în sălile de operaţii (de obicei în asociaţie cu agenţi chimici).

1.3.3. Dezinfecţia prin ultrasunete are la bază fenomenul de cavitaţie („fierbere la rece") care se produce la propagarea undei ultrasonore în apă. Se utilizează la dezinfecţia şi curăţirea instrumentarului stomatologic şi chirurgical: ultrasonare în băi cu soluţii de detergenţi.

1.3.4. Dezinfecţia chimică. Substanţele dezinfectante utilizate în R.S.R., domeniile de aplicaţie şi modul de utilizare sînt prezentare rezumativ în tabelul 1-6.

De reţinut ! Soluţiile dezinfectante şi antiseptice se inactivează în timp, mai ales prin adaos de substanţe organice. De aceea ele se vor reînnoi cu periodicitate riguroasă. Pentru antiseptizarea mîinilor nu se vor introduce mîinile în vasul cu soluţie antiseptică. Soluţia antiseptică se toarnă peste mîini !

1.4. Conservarea

1.4.1. Conservarea prin refrigerare. Refrigerarea are efect inhibitor asupra dezvoltării microorganismelor. Păstrarea la temperaturi de 0-4°C în frigidere este o metodă de conservare pentru durată limitată a majorităţii produselor patologice destinate examenelor microbiologice şi serologice, a majorităţii culturilor microbiene, a unor medicamente, a alimentelor.

Congelarea la temperaturi inferioare punctului eutectic (-21,3°C) este o metodă superioară de conservare. Se realizează în

Tabelul 1-6

Principalele antiseptice şi dezinfectante comercializate în R.S.R.: domenii[1] şi mod de utilizare

Substanţa/Preparatul	Antiseptizarea mîinilor		Dezinfecţia antituberculoasă			Fecale	Veselă contaminată de pacienţi cu		
	Igienică	Chirurgicală	Spută	Lenjerie	Veselă		Stafilococi ş.a. (prevenirea inf. de spital)	Contagioşi fără tuberculoză	Dermatomicoze
Alcool etilic	70%-1 min.	80% 5 min.	-	-	-	-	-	-	-
Alcool 70° + iod o,5%	-	5 min.	-	-	-	-	-	-	-
Bromocet (detergent cationic)	1% 2 min.	-	-	-	-	-	-[2]	-	-
Cloramină B (25-29% clor activ)	o,4%-2 min.	-	4%-4h	3%-4h	-	4%-6h	1%-4h	o,5%-4h	o,5%-4h
Clorură de var-suspensie (25% clor activ)	-	-	10%-6h	-	10%-4h	10%-6h	-	-	-
Fenol	-	-	-	2%-4h 1%-12h	3%-4h	-	-	-	-
Fenosept (borat fenil mercuric sol. apoasă 2%o)	o,1%o[3] 2 min.	o,1%o[3] 5 min.	-	-	-	-	-	-	-
Formaldehidă	-	-	-	3%-4h 1,5%-12h	3%-4h	-	3%-4h	2%-4h	3%-4h
Lapte de var	-	-	-	-	-	20%-6h	-	-	-
Oxicianură de mercur	o,5%[2] 2 min.	-	-	-	-	-	-	-	-
Septosol (Iodofor)	-	1000 ppm[3,4] 5 min.	-	-	-	-	-	-	-
Tego 103 G (detergent amfoter)	-	-	-	2%-12h	-	-	5%-4h	2%-4h	2%-4h
Tego 103 S	2% 2 min.	2x5ml 1% 5 min.	-	2%-12h	-	-	5%-4h	2%-4h	2%-4h

[1] pentru alte domenii de aplicare decît cele cuprinse în tabel a se vedea textul. [2] conform antiseptogramei. [3] după aplicări repetate poate apărea sensibilizare. [4] ppm=părţi ptr. un milion.

Scanned with OKEN Scanner

1.4.

conservatoare (-25°C), în containere cu amestec de gheaţă carbonică şi alcool (-78,9°C) sau cu azot lichid (-196°C) şi este indicată pentru produse patologice destinate examenului virologic, seruri, suspensii microbiene ş.a.

Criodesicarea sau liofilizarea presupune sublimarea apei (structurale şi de solvatare) în vid şi este indicată pentru conservarea suspensiilor microbiene, vaccinurilor, serurilor, sîngelui şi derivatelor de sînge, ţesuturi ş.a. Produsele conservate prin criodesicare se păstrează închise ermetic sub vid sau în atmosferă de gaz inert.

1.4.2. Conservarea prin căldură

Pasteurizarea foloseşte căldura umedă şi are o largă aplicaţie în conservarea pentru durată scurtă a unor alimente. In funcţie de temperatura utilizată distingem pasteurizarea la temperatură înaltă, pasteurizarea la temperatură mijlocie şi pasteurizarea la temperatură joasă (tabelul 1-7). In acest mod sînt distruse

Tabelul 1-7

Tipurile de pasteurizare şi aplicaţiile lor (după Schmidt, Naumann şi Horsch)

Tipul de pasteurizare	Temperatura	Timpul pentru		
		Lapte	Sucuri de fructe, vin	Alte alimente
Pasteurizare înaltă	85°C	8-15 sec.	2 min.	-
Pasteurizare mijlocie	71-74°C	4o-45 sec.		15 min.
Pasteurizare joasă	62-65°C	3o min.		3o min.

formele vegetative ale bacteriilor patogene ca şi ale celor saprofite, fungilor şi levurilor, dar nu sînt distruşi sporii bacterieni şi virusurile mici fără înveliş lipidic (de exemplu, enterovirusuri) Refrigerarea imediată la 4°C păstrează condiţia microbiologică realizată prin pasteurizare.

Notă: prevenirea toxiinfecţiei botulinice prin alimente conservate (fasole verde, peşte, carne de porc ş.a.) presupune sterilizarea lor.

1.4.3. Deshidratarea şi presiunea osmotică crescută inhibă dezvoltarea microorganismelor prin deshidratare celulară şi sînt utilizate în conservarea alimentelor. Presiunea osmotică suficientă pentru conservare se realizează prin soluţii de clorură de sodiu 1o-15% (saramurarea alimentelor) sau zaharoză 5o-7o% (dulceţuri, si-

ropuri). Presiunea osmotică realizată prin zaharoză este utilizată şi pentru conservarea unor medicamente (siropuri).

1.4.4. Conservarea prin agenţi chimici (tabelul 1-8).

Tabelul 1-8

Cîteva exemple privind domeniul şi modul de utilizare a unor agenţi chimici de conservare

Substanţa	Domeniul de aplicare	Concentraţia (%)
Fenol	seruri imune vaccinuri	o,3-o,5
Mertiolat de sodiu	seruri imune preparate injectabile	o,oo4-o,o2
Fenol+mertiolat	seruri imune colire	o,2+o,oo5 o,oo2+o,o1
Benzoat de sodiu	unguente emulsii alimente	o,2-1 o,1-1

1.5. Metodica lucrului aseptic în laboratorul de microbiologie

Obiective:

- evitarea contaminării materialului manipulat cu microbi din mediul extern (praf din aer, microbi de pe suprafeţe ş.a.) sau provenind de la manipulator (picături Flügge, microbi de pe tegumentele mîinii, scuame, păr ş.a.);
- evitarea contaminării mediului extern cu microbi din materialul manipulat (manipularea culturilor microbiene, a produselor patologice ş.a.).

Se lucrează la adăpost de curenţi de aer. Cînd este cazul se lucrează în încăperi speciale lipsite de pulberi, în care aerul şi suprafeţele de lucru sînt dezinfectate (săli de operaţie, hote şi boxe sterile) şi se poartă îmbrăcăminte specială sterilă (intervenţii chirurgicale, manipulări în industria medicamentului): bonetă, mască, halat, mănuşi sau chiar combinezon pentru lucru steril.

Materialele şi instrumentele chirurgicale, seringile ş.a. se manipulează la scoaterea din cutii, casolete sau în timpul montării cu ajutorul unei pense sterile (pensa se menţine într-o soluţie dezinfectantă, de exemplu lizol 3%).

Manipularea în condiţii aseptice a produselor microbiene (culturi, produse patologice ş.a.) (fig. 1-11)

In cursul manipulării operatorul nu vorbeşte, poartă bonetă care strînge părul, eventual mască; uşile şi ferestrele sînt închise. Se lucrează strict deasupra mesei a cărei suprafaţă este acoperită în aria de lucru cu o coală de hîrtie de filtru umezită cu soluţie 5% de acid fenic.

(1) Instrumentul cu care se face manipularea, sterilizat în prealabil (pipete, seringi) sau sterilizat în momentul utilizării (ansa, pipeta capilară), se ţine în mîna dreaptă cît mai aproape de extremitatea opusă celei care se introduce în recipient. Ansa se ţine ca un creion. Pipetele se ţin între police şi medius cu indexul aplicat pe orificiul astupat cu vată iar auricularul şi inelarul libere.

(2) Recipientul din care se prelevă sau în care urmează a fi depus materialul manipulat (produs microbian, substanţă sterilă ş.a.) se ţine de extremitatea inferioară în mîna stîngă în aşa fel încît conţinutul şi traiectoria instrumentului de manipulare să poată fi controlat permanent cu vederea.

(3) Se scoate dopul recipientului cuprinzîndu-l între auricular şi palma mîinii drepte. Cît timp recipientele sînt fără dop se menţin înclinate pentru a evita depunerea în interior a pulberilor din atmosferă.

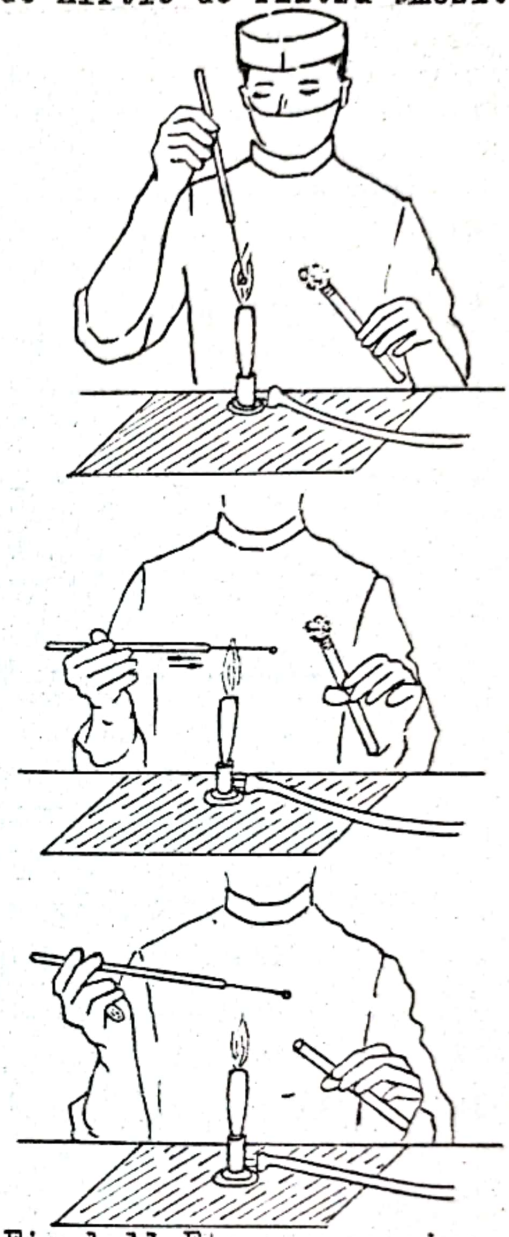


Fig.1-11 Etape succesive ale unei manipulări aseptice

(4) Se sterilizează prin flambare gura recipientului.

(5) Se introduce instrumentul şi se face prelevarea sau depunerea materialului în recipient după care se retrage cu grijă pentru a evita atingerea pereţilor şi mai ales a gurii recipientului (fig. 1-12).

(6) Se flambează din nou gura recipientului. Se introduce dopul.

(7) Se sterilizează ansa cu precauţia de a nu introduce brusc

bucla în flacără. Urme de lichid de pe ansă pot intra brusc în fierbere stropind şi contaminînd suprafeţele din jur. De aceea recomandăm ca înainte de resterilizare bucla ansei să se descarce de restul produsului microbian prin imersare într-un recipient (pahar Berzelius, balon Erlenmeyer de 100-200 ml) umplut cu amestec de nisip şi soluţie 5% de acid fenic (2/3 - volum/volum) Pipetele se depun în cilindrul pentru pipete contaminate. După manipulare, pipetele nu se sterilizează niciodată prin flambare.

Toate manipulările aseptice se fac sub controlul vederii.

Metodica lucrului aseptic în spitale, bazată pe aceleaşi principii, va fi însuşită cu ocazia stagiilor clinice.

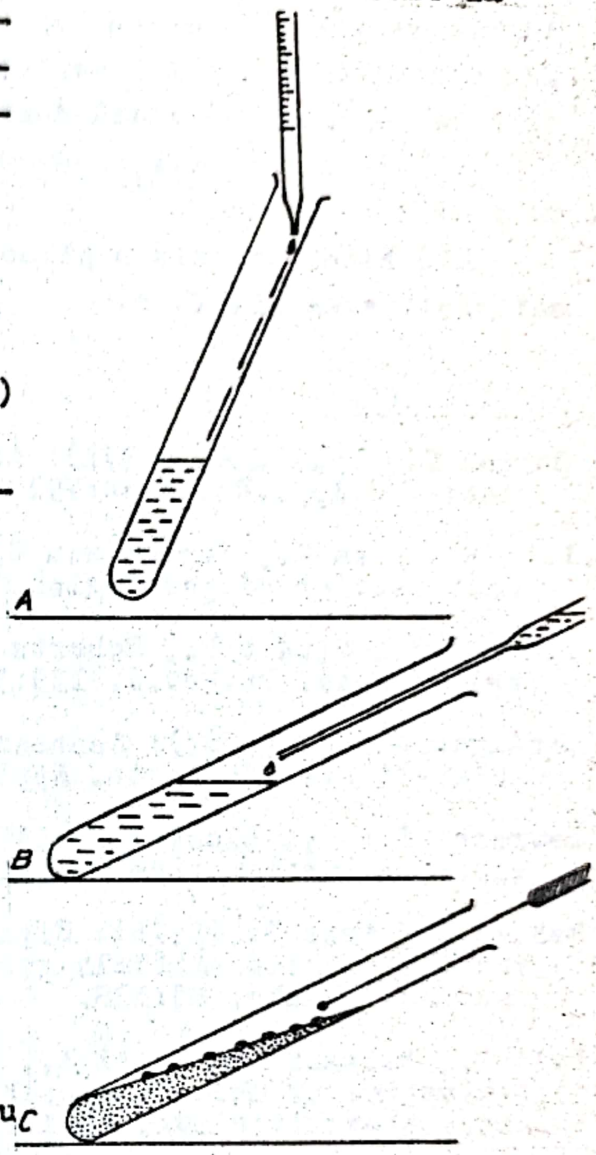


Fig. 1-12 Manipulări aseptice cu pipeta şi cu ansa

1.6. Norme pentru protecţia muncii specifice laboratorului de microbiologie

(1) In laborator se lucrează cu îmbrăcăminte de protecţie (halat, bonetă, iar la nevoie mască, mănuşi şi ochelari de protecţie). Persoanele cu părul lung nu au acces la masa de lucru decît cu părul strîns, cu suficiente agrafe, în coc şi legat cu basma.

(2) Nu se părăseşte laboratorul cu îmbrăcămintea de lucru.

(3) Se lucrează cu cea mai mare atenţie, numai deasupra mesei de lucru şi numai după ce regulile lucrului aseptic au fost bine însuşite. La manipularea microbilor înalt patogeni suprafaţa de lucru a mesei trebuie acoperită cu hîrtie absorbantă umezită cu soluţie 5% de acid fenic.

(4) In caz de contaminare (suprafaţa de lucru, mîini ş.a.), se iau imediat măsuri de decontaminare; din încăperea de lucru nu lipsesc niciodată recipientul cu soluţie dezinfectantă (cloramină B soluţie 4%, acid fenic 2-5%) şi antiseptică (cloramină B 0,4%).

Scanned with OKEN Scanner

(5) Pe suprafeţele de lucru se exclude prezenţa oricăror obiecte în afara celor cu care se lucrează iar acestea trebuie să fie aranjate în cea mai perfectă ordine, ordinea operaţiunilor, care se respectă pe toată durata activităţii.

(6) Este interzis consumul de alimente şi fumatul în încăperile de lucru.

(7) Este interzis a părăsi masa de lucru fără spălarea şi antiseptizarea mîinilor.

BIBLIOGRAFIE

Bergan T., Lystad A. (1971): Antitubercular action of disinfectants. J.Appl.Bact. 34:751.

Duca E., Duca M., Furtunescu G. (1979): Microbiologie medicală. Ed.didactică şi pedagogică, Bucureşti, pp. 87-134.

Evans D.H., Stuart P., Roberts D.H. (1977): Disinfection of animal viruses. Br.Vet.J. 133:356.

Grossgebauer K. (1967): Assessment of virucidal ability of chemical disinfectants. Appl.Microb. 15:316.

Lavrence C.A. şi Block S.S. (1968): Disinfection, sterilization and preservation, Lea & Febiger, Philadelphia.

Mahnel H., Kunz W. (1976): Eignung von Keimtragern zur Prüfung von Desinfektionsmitteln gegenuber Virusarten. Berl.Münch. Tierärztl.Wschr. 89:138.

Poli G., Balsari A., Ponti W., Ceccarelli A., Fesce E. (1979): Evaluation of the antimicrobial activity of disinfectants. Arch.Lebensmittelhyg. 3o:12o.

Poli G., Micheletti R., Ponti W., Cantoni C. (1978): Über die Viruzidie einiger Disinfektionsmittel auf Basis amphoterer, kationischer und kationogener oberflächenaktiver Stoffe (Tego). Arch.Lebensmittelhyg. 29:92.

Schmidt J., Naumann G., Horsch W. (1968): Sterilisation, Desinfektion und Entwesung, VEB Georg Thieme, Leipzig.

Spaulding E.H., Gröschel D.H.M. (1974): Hospital disinfectant and antiseptics. In Lennette E.H., Spaulding E.H., Truant J.P. (editori) - Manual of clinical microbiology, ed. 2-a, American Society for Microbiology.

Scanned with OKEN Scanner

PARTEA II-a

METODE DE DEPISTARE SI TEHNICI GENERALE PENTRU IDENTIFICAREA MICROBILOR

Scanned with OKEN Scanner

2. MICROSCOPIA OPTICA IN STUDIUL PRACTIC AL MICROBILOR

DUMITRU T. BUIUC

2.1. Microscopul optic

Depistarea rapidă a microbilor ca şi studiul morfologiei, aşezării şi al unor detalii structurale necesare identificării lor le realizăm prin examen microscopic. De aceea microscopul optic este un aparat indispensabil laboratorului de microbiologie, iar microbiologul trebuie să fie un bun cunoscător al tehnicilor microscopice. Dar manipularea microscopului optic şi tehnicile microscopice elementare, pentru utilitatea datelor pe care le aduc în diagnosticul infecţiei (→ 6.2.2.), trebuie cunoscute de orice medic. Pentru aceste motive, procedăm mai întîi la recapitularea noţiunilor despre microscop.

2.1.1. Definiţie şi principiu de funcţionare

Microscopul este un aparat complex care permite evidenţierea şi studiul detaliilor morfologice şi de structură ale unor obiecte de dimensiuni reduse, invizibile cu ochiul liber. Microscopul optic este format în esenţă din 2 sisteme cuplate de lentile: (i) obiectivul, sistem de lentile cu distanţa focală de ordinul mm, situat către obiectul examinat, şi (ii) ocularul, sistem de lentile cu distanţa focală de ordinul cm, situat către ochiul examinatorului. Obiectivul formează imaginea reală, mărită şi răsturnată a obiectului de examinat (imaginea primară) cînd acesta este plasat dincolo de distanţa focală, dar în imediata ei apropiere. Ocularul funcţionează ca o lupă: reia imaginea primară, formată înăuntrul distanţei focale, dar în apropierea focarului, şi o transformă într-o imagine virtuală, mărită şi dreaptă (imaginea finală) Astfel, în raport cu obiectul, imaginea finală este o imagine virtuală, răsturnată şi mult mărită. Două condiţii controlează funcţionarea cuplată a obiectivului şi ocularului: (i) coaxialitatea sistemelor şi (ii) formarea imaginii primare înăuntrul distanţei focale a ocularului şi în apropierea acesteia (fig. 2-1).

Scanned with OKEN Scanner

2.1.

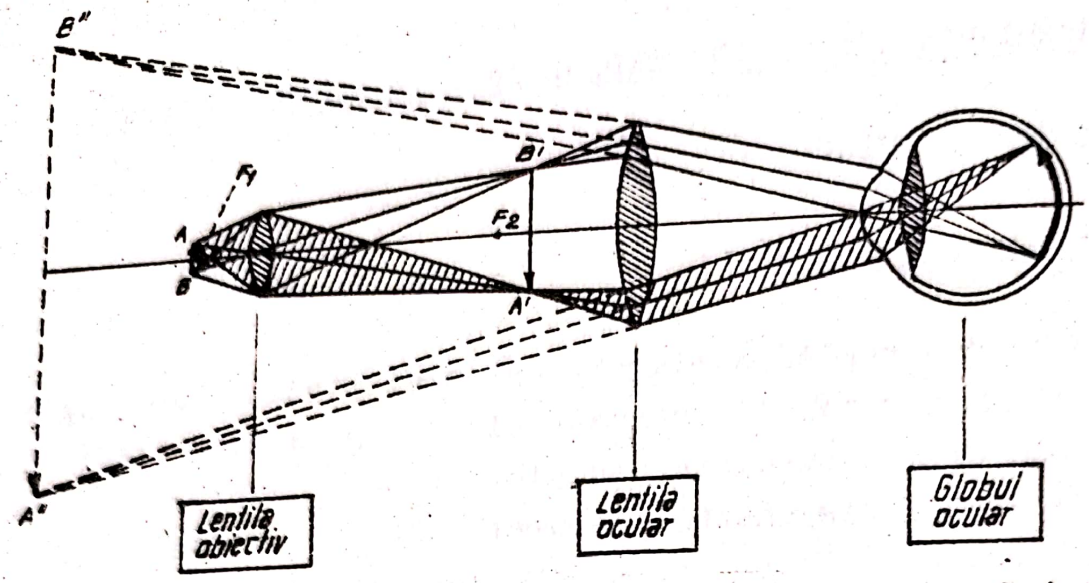


Fig.2-1 Schema sistemului optic al microscopului. AB=obiectul. F_1=focarul obiectivului. A'B'=imaginea reală, mărită şi răsturnată a obiectului plasată la o distanţă mai mică decît distanţa focală a ocularului, mai aproape de focar. F_2=focarul ocularului. A''B''=imaginea virtuală, mult mărită şi răsturnată în raport cu obiectul, obţinută la distanţa minimă a vederii clare a observatorului (2o-25 cm), care corespunde aproximativ nivelului mesei port-obiect a microscopului.

2.1.2. Descrierea microscopului optic. Orice microscop optic presupune în compunerea sa: (i) o parte mecanică, (ii) un sistem optic şi (iii) un sistem de iluminare (fig.2-2).

2.1.2.1. Partea mecanică. Talpa (23/fig.2-2) este suportul care asigură stabilitatea întregului aparat. Pe talpă este fixat corpul ansamblului mişcărilor (2/fig.2-2) care poartă:

- Braţul microscopului (8/fig.2-2) pe care este fixat suportul sistemului optic, tubul microscopului (1o/fig.2-2). Mişcarea tubului în axul optic al microscopului este asigurată prin deplasarea braţului în plan vertical prin dispozitivele de focalizare grosieră şi fină acţionate prin butoane*) (respectiv 4 şi 3/fig. 2-2). Butonul mişcării fine are tamburul divizat în 5o diviziuni fiecare corespunzînd la o mişcare de o,oo2 mm a tubului. Mişcarea diviziunilor se urmăreşte în raport cu indicele triunghiular de referinţă gravat pe un inel concentric cu butonul mişcării fine şi fixat pe corpul ansamblului mişcărilor (7/fig.2-2). Limitele

*) Aceste butoane mai sînt uneori desemnate cu numele de „viză micrometrică" şi respectiv „viză micrometrică".

domeniului de lucru al mişcării fine (cca 1,7 mm) sînt gravate prin 2 repere pe corpul ansamblului mişcărilor şi un indice pe culisa mişcării fine (6/fig.2-2). Pentru a păstra permanent capacitatea de deplasare a tubului microscopului în cele 2 sensuri şi a evita degradarea lentilei frontale a obiectivului prin apăsare pe lamă, se recomandă ca indicele să fie adus la începutul lucrului la mijlocul cursei marcată de cele 2 repere.

- Suportul condensorilor (2o/fig.2-2) acţionat pentru focalizare printr-un buton (21/fig.2-2).

- Masa port-obiect*) (15/fig.2-2) prevăzută cu o deschidere centrală pentru iluminarea obiectului, suporţi reglabili pentru fixarea lamei port-obiect (14/fig.2-2) şi 2 butoane concentrice (19/fig.2-2) care controlează mişcările mesei pe 2 direcţii perpendiculare, transversală şi longitudinală, cu o precizie de o,1 mm urmărită printr-un sistem vernier pentru fiecare direcţie.

2.1.2.2. Sistemul optic este purtat de tubul microscopului. Obiectivele (13/fig.2-2) se adaptează la partea inferioară a tubului printr-un cap revolver (12/fig.2-2) cu ajutorul căruia pot fi aduse pe rînd în axul optic al microscopului. Ocularele (9/fig.2-2) se adaptează prin telescopare la partea superioară a tubului. Microscoapele moderne permit examinarea binoculară prin montarea la tub a unui cap binocular (11/fig.2-2) prevăzut cu prisme pentru schimbarea direcţiei fasciculului luminos şi divizarea lui către cele 2 oculare. Capul binocular permite adaptarea ocularelor la distanţa interpupilară a examinatorului şi este prevăzut, la tubul ocular din stînga, cu un dispozitiv inelar pentru corecţia ametropiei ochiului.

2.1.2.2.1. Parametrii sistemului optic

Puterea de mărire a unui microscop se calculează multiplicînd puterea de mărire a obiectivului cu puterea de mărire a ocularului folosite la examinare şi, la microscoapele binoculare, cu cea a capului binocular (valori care sînt gravate pe montura fiecăreia din aceste piese). Puterea de mărire se exprimă printr-un număr care arată de cîte ori diametrul imaginii este mai mare decît diametrul obiectului real.

---

*) Uneori desemnată cu numele de „platină".

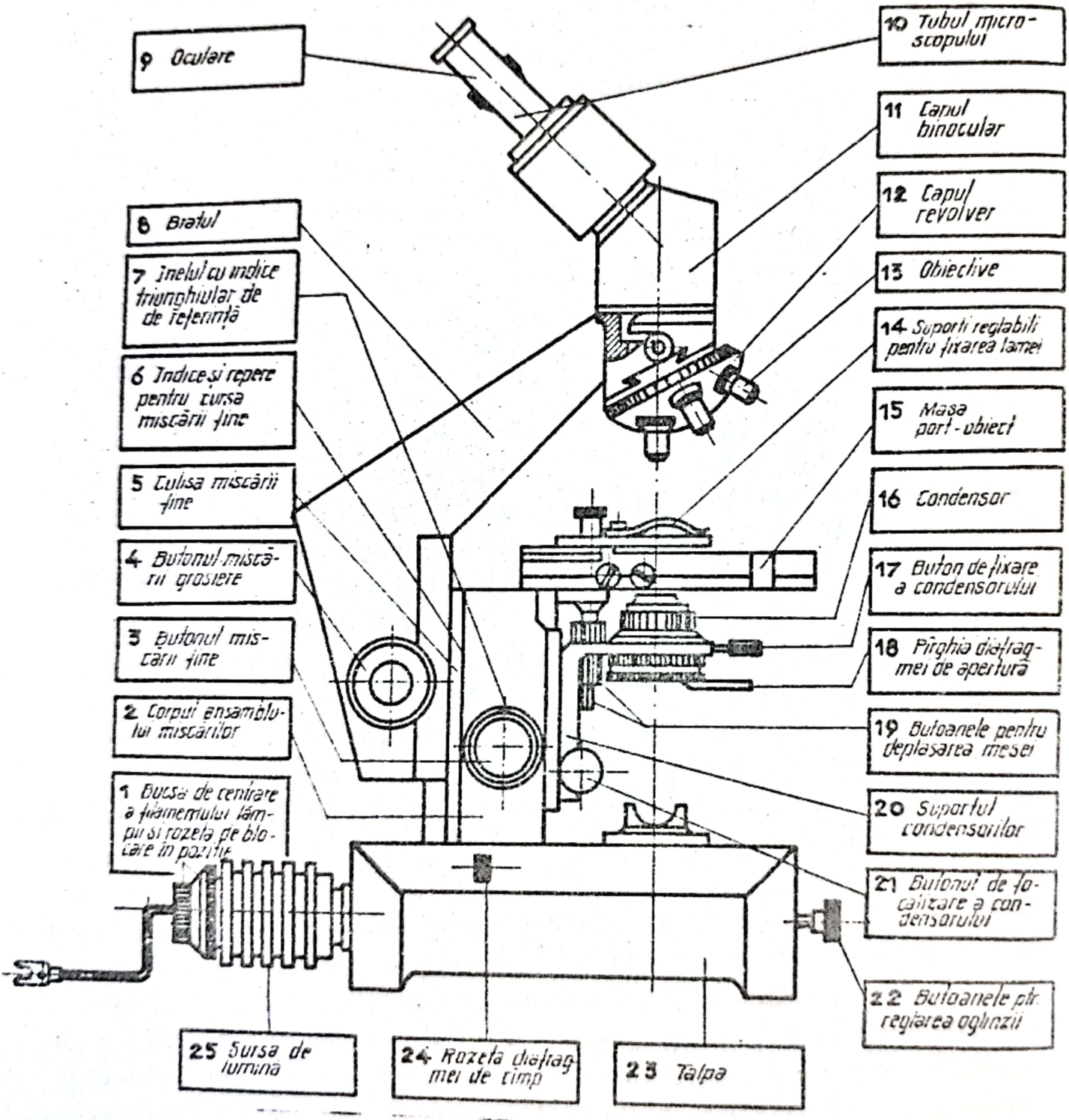


Fig.2-2 Schema microscopului ML-4M produs de Intreprinderea Optică Română

Dar

$$\text{puterea de mărire a obiectivului} = \frac{\text{lungimea mecanică a tubului}^{\bullet)}}{\text{distanţa focală a obiectivului}}$$

Deci puterea de mărire a obiectivului este invers proporţională cu distanţa focală a acestuia. De aici derivă o altă mărime cu importanţă practică: distanţa de lucru a obiectivului, exprimată prin distanţa dintre lentila frontală a obiectivului cînd acesta este focalizat pe un preparat subţire şi suprafaţa lamelei de acoperire a preparatului. Cu cît este mai mare puterea unui obiectiv cu atît este mai mică distanţa de lucru (fig.2-3).

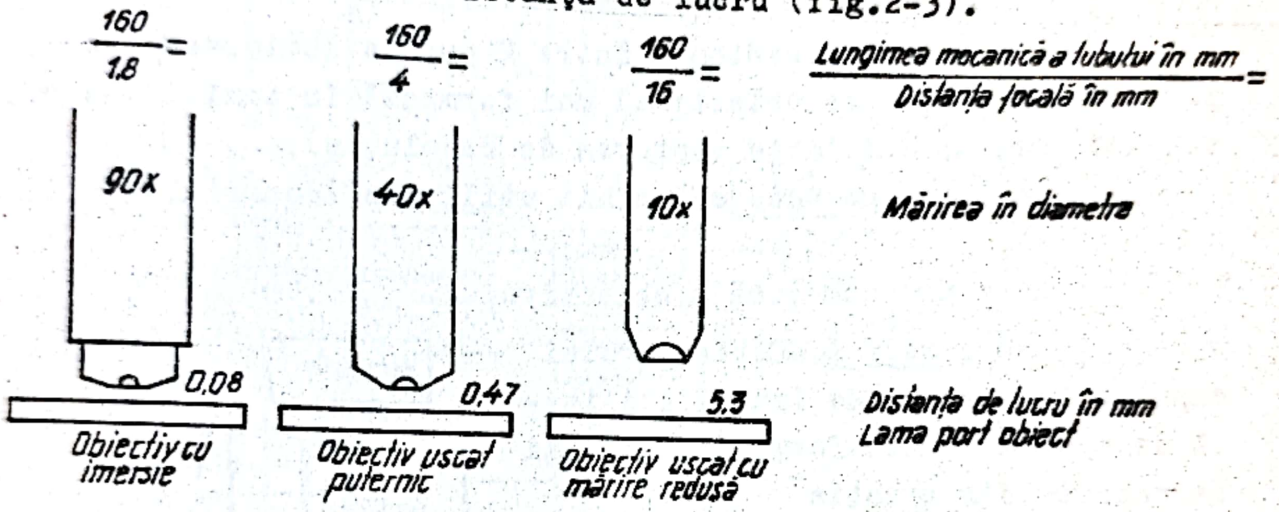


Fig.2-3 Relaţia între distanţa focală, puterea de mărire şi distanţa de lucru a obiectivelor

DE RETINUT !

Obiectivele cu mărire puternică avînd distanţa de lucru scurtă trebuie manipulate cu atenţie în timpul focalizării imaginii pentru a evita degradarea lentilei frontale a obiectivului prin apăsare excesivă pe lamă. Dacă nu se respectă întocmai indicaţiile date mai departe (⟶ 2.2.2.3.), această apăsare excesivă poate fi ignorată din cauza particularităţilor sistemului mecanic de deplasare a tubului, care amplifică forţa cu care se acţionează butoanele de focalizare.

Grosimea preparatului care poate fi văzută la un moment dat în focar ca şi aria preparatului investigată scad odată cu distanţa focală a obiectivului. De aceea pentru examenul de ansamblu al unu preparat sînt indicate obiective cu putere de mărire mică

•) Distanţa de la filetul obiectivului pînă la lentila oculară a ocularului, pentru majoritatea microscoapelor 160 mm.

(profunzime focală mare) iar pentru examenul detaliilor obiective puternice (profunzime focală mică).

Mărirea utilă este mărirea care oferă o imagine cu detalii a obiectului real. Cînd depăşeşte o anumită limită mărirea nu mai oferă aceste detalii şi devine mărire goală, inutilizabilă. Mărirea utilă a microscopului depinde de puterea de rezoluţie a obiectivului. Ecuaţia care defineşte puterea de rezoluţie a obictivului este

$$d = \frac{\lambda}{2AN} \quad \text{unde}$$

d = cea mai mică distanţă între 2 puncte luminoase ale preparatului pentru care obiectivul mai formează în ochiul observatorului imagini distincte (puterea de rezoluţie);

λ = lungimea de undă a luminii utilizate (domeniul vizibil 400-750 nm);

AN = apertura numerică a obiectivului.

Apertura numerică a obiectivului exprimă cantitatea de lumină utilizată de acesta pentru formarea imaginii Ea rezultă din ecuaţia

$$AN = n.\sin\alpha \quad \text{unde}$$

n = indicele de refracţie al mediului interpus între obiect şi lentila frontală a obiectivului;

α = semiunghiul de deschidere al lentilei frontale a obiectivului, unghi cu vîrful în focar (fig. 2-4).

Obiectivele uscate, obiectivele la care mediul interpus între obiect şi lentila frontală a obiectivului este aerul, au apertura numerică teoretică maximă 1: indicele de refracţie (n) al aerului = 1, iar $\sin 90^{\circ}=1$ (valoarea maximă a unghiului α cînd lentila frontală a obiectivului este aplicată pe obiect). Apertura numerică maximă practică a obiectivelor uscate este însă 0,95.

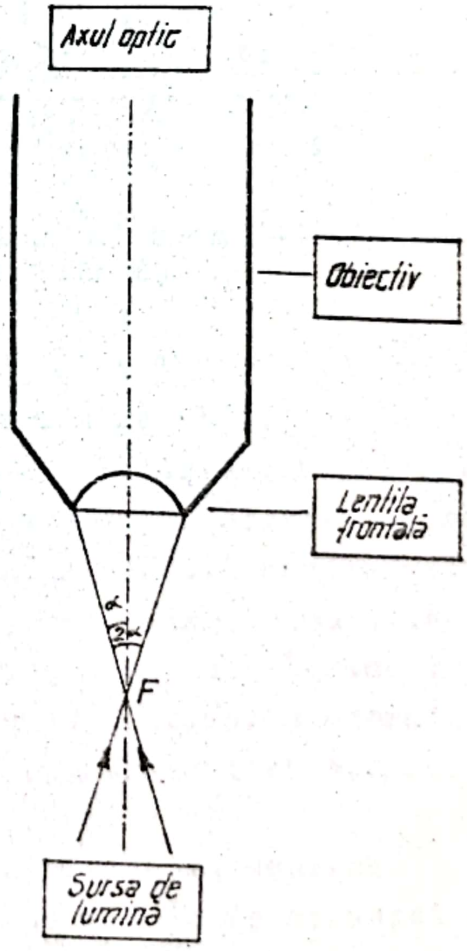


Fig.2-4 Reprezentare schematică a unghiului de apertură

Obiectivele cu imersie sînt obiective la care mediul interpus între obiect şi lentila frontală are un indice de refracţie (n) mai mare decît al aerului şi apropiat de cel al sticlei, de exemplu uleiul de cedru cu n = 1,515 egal cu al sticlei crown (fig.2-5). Apertura numerică maximă practică a obiectivelor cu imersie este de 1,4 (realizată la obiectivele apocromate). Obiectivele cu imersie utilizate curent au apertura numerică de 1,25 sau 1,3o.

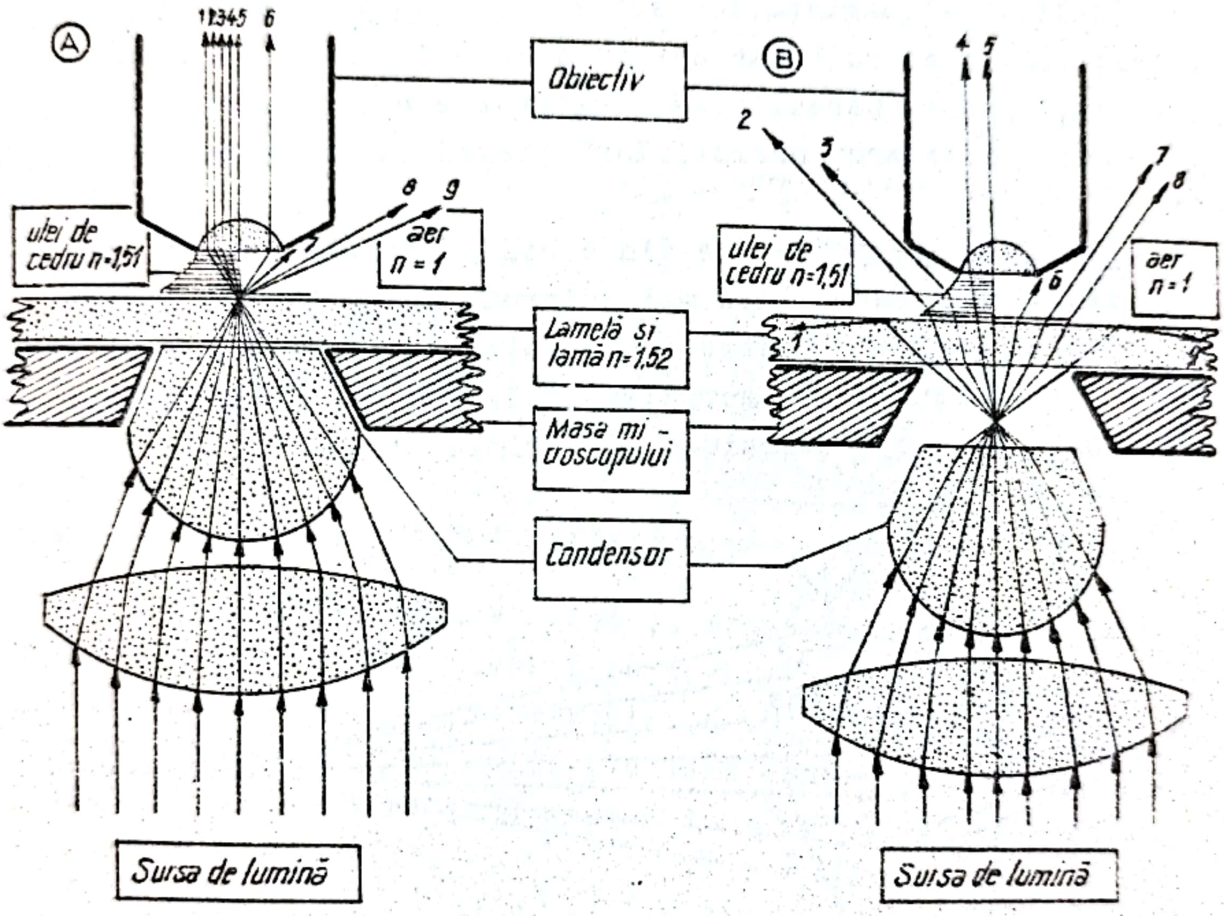


Fig.2-5 Drumul schematic al razelor de lumină prin condensor şi mediul interpus între preparat şi lentila frontală a unui obiectiv cu putere de mărire mare. Rolul condensorului în iluminarea obiectului şi rolul uleiului de cedru în creşterea aperturii numerice a obiectivelor puternice. Distanţa de lucru mică a acestor obiective este condiţia care permite utilizarea lichidului de imersie.

A - Condensorul ridicat la maximum (lentila frontală a condensorului în contact cu lama port-obiect) oferă întregul con de lumină pentru iluminarea obiectului. Uleiul de cedru plasat între preparat şi lentila frontală a obiectivului împiedică pierderea prin refracţie a razelor cu valoare în formarea imaginii (razele 1-5), imaginea apare cu detalii pe un cîmp microscopic bine iluminat. Prin refracţie în aer, în lipsa uleiului de cedru, o parte din razele cu valoare în formarea imaginii sînt pierdute (razele 7-9), imaginea apare săracă în detalii pe un cîmp insuficient iluminat.
B - Condensorul coborît: conul de lumină oferit pentru iluminarea obiectului se reduce.

Din ecuaţia puterii de rezoluţie rezultă că pentru o apertură numerică dată, puterea de rezoluţie creşte numai prin scăderea lungimii de undă a luminii utilizate. De exemplu, un obiectiv cu apertura numerică 1,4 asigură la examenul cu lumină monocromă verde o putere de rezoluţie (d) = 55o nm/2.1,4 = 19o nm, iar la examenul cu lumină monocromă albastră o putere de rezoluţie (d) = 46o nm/2.1,4 = 16o nm. Puterea de rezoluţie a microscopului optic mai poate creşte numai prin examinare în ultraviolet.

Calitatea imaginii depinde şi de capacitatea definitorie a obiectivului, capacitatea acestuia de a forma imagini cu un contur net, precis. Capacitatea definitorie a obiectivului se asigură prin corectarea aberaţiilor sferică şi cromatică a lentilelor.

Aberaţia sferică apare din cauză că razele pornite din acelaşi punct sînt refractate mai puternic la periferia lentilei decît spre centrul ei. Pentru acest motiv razele periferice focalizează într-un punct mai apropiat de lentilă decît cele centrale. Rezultatul este o distorsiune a imaginii (fig.2-6).

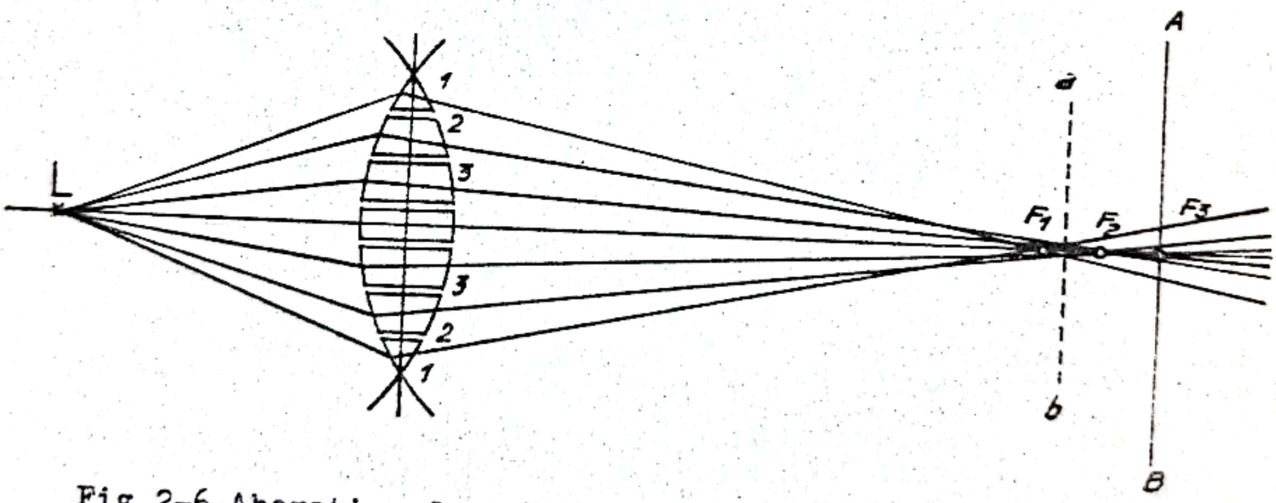


Fig.2-6 Aberaţia sferică a unei lentile. Zonele inelare ale lentilei au focare proprii la distanţe diferite: mai aproape de lentilă cele periferice şi progresiv îndepărtate cele centrale. Pe ecranul AB, în focarul F3 imaginea punctului luminos L apare ca un punct luminos cu o aureolă relativ mare şi slabă. Deplasînd ecranul spre focarul F1 ajungem într-o poziţie ab în care imaginea punctului L este cea mai netă (diametrul minim şi iluminare relativ uniformă). O asemenea corecţie a aberaţiei sferice se numeşte „prin lipsă", spre deosebire de corecţia realizată prin asocierea de lentile care este o corecţie „prin exces" (creşterea distanţei focale a zonelor marginale ale lentilei dincolo de cea a zonelor centrale)

Aberaţia cromatică apare din cauză că la trecerea prin lenti-

la lumina albă este descompusă în radiaţiile componente care, datorită refracţiei diferite pentru fiecare lungime de undă, nu se mai focalizează în acelaşi punct pentru a recompune lumina albă. Radiaţiile violete se focalizează mai aproape de lentilă iar cele roşii mai departe. Pentru acest motiv imaginea unui punct luminos apare ca un cerc înconjurat de culorile spectrului (fig.2-7).

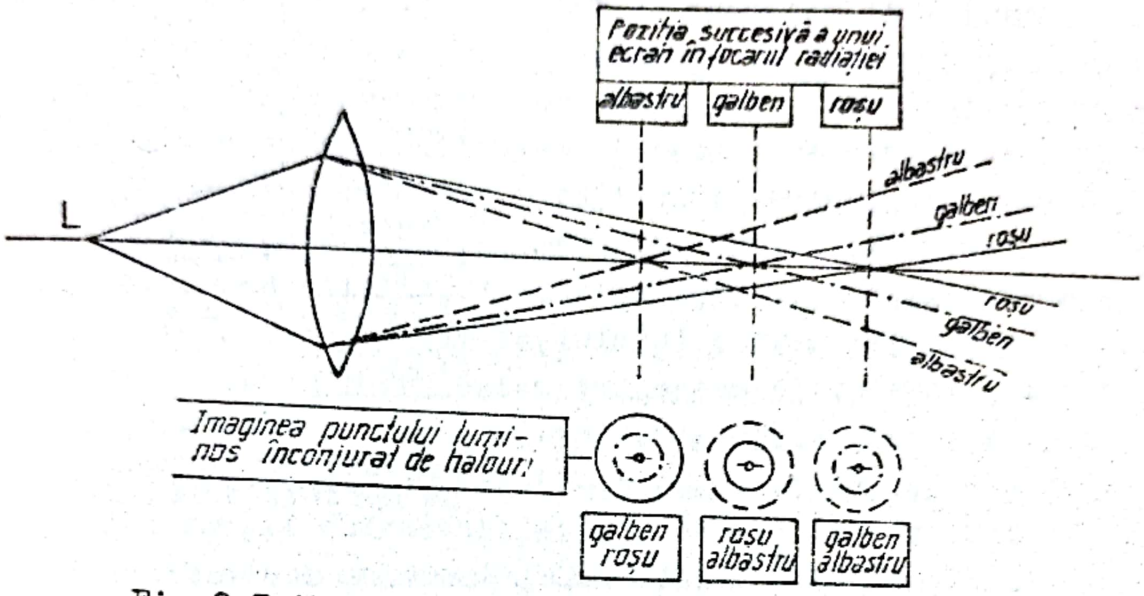


Fig.2-7 Aberaţia cromatică a unei lentile

Corecţia aberaţiilor, sferică şi cromatică, se face asociind o lentilă convexă cu una concavă cu curburi egale, deci cu aberaţii egale dar de semn contrar. Pentru a păstra convergenţa sistemului, lentila convexă se confecţionează dintr-o sticlă cu indice de refracţie superior (sticlă crown) celui al lentilei concave (sticlă flint) (fig.2-8).

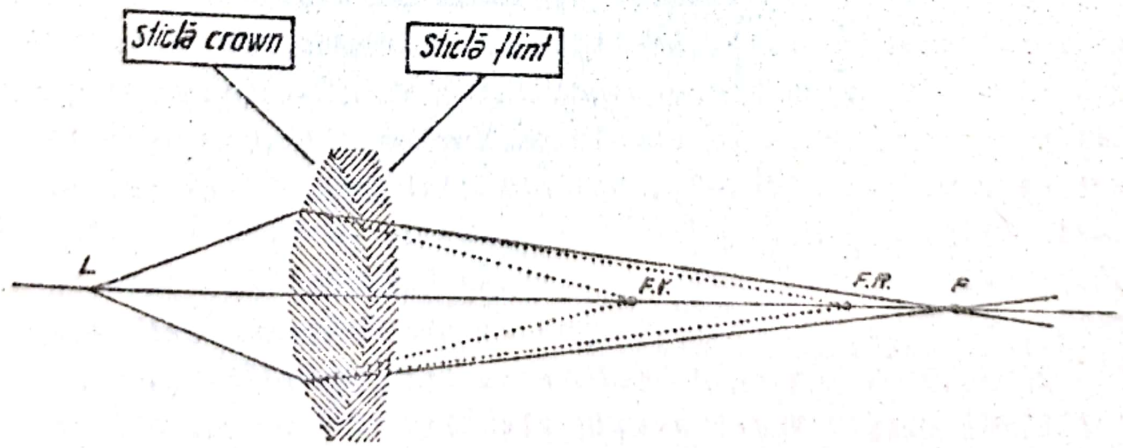


Fig.2-8 Corecţia aberaţiei cromatice într-un sistem acromat presupune suprapunerea focarului a două radiaţii diferite

Obiectivele acromate au aberaţia cromatică corectată prin su-

prapunerea focarului a 2 radiaţii. Sînt obiectivele utilizate în microscopia curentă.

Obiectivele apocromate au aberaţia cromatică corectată prin suprapunerea focarului a 3 radiaţii şi totodată au o apertură numerică maximă (1,4). Sînt obiective scumpe şi se folosesc numai în scopuri limitate (microfotografii ş.a.)

Pentru a putea alege obiectivul care asigură cele mai bune performanţe într-un scop dat, pe montura fiecărui obiectiv sînt gravaţi parametrii după care ne ghidăm în această alegere: puterea de mărire, apertura numerică, gradul de corecţie a aberaţiilor (acromat, apocromat), lungimea mecanică a tubului şi grosimea lamelei de acoperire pentru care a fost corectat obiectivul (fig.2-9). Microscopia curentă în laboratorul de microbiologie clinică necesită următoarele obiective acromate: 10x/o,3o/-, 40x/o,65/o,17 şi 90x/1,25 sau 1,3o/o,17 la care se asociază, după necesităţile de mărire, ocularele 5x, 7x sau 1ox.

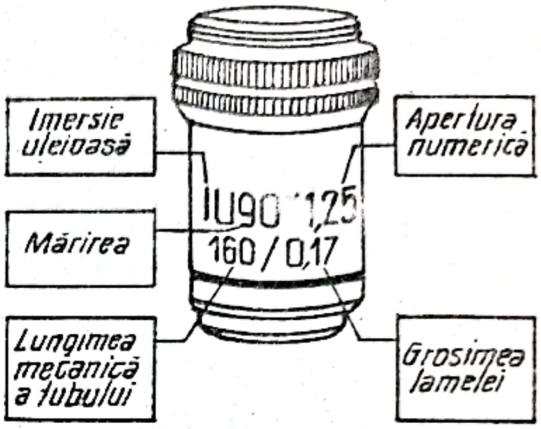


Fig.2-9 Parametrii gravaţi pe montura obiectivului

2.1.2.3. Sistemul de iluminare

2.1.2.3.1. Sursa de lumină. Pentru iluminarea preparatului microscopic se poate folosi lumina solară sau o sursă de lumină artificială exterioară microscopului şi suficient de puternică. Lumina este dirijată prin deschiderea mesei port-obiect către preparat cu ajutorul unei oglinzi. La microscoapele moderne sursa de lumină este inclusă în talpa microscopului (25/fig.2-2), la fel şi dispozitivele de dirijare a fascicolului luminos către preparat: diafragma de cîmp (24/fig.2-2), oglinda şi butoanele pentru reglarea oglinzii (22/fig.2-2).

2.1.2.3.2. Condensorul de cîmp luminos (16/fig.2-2) este un sistem de lentile care focalizează lumina asupra preparatului (fig.2-5) contribuind esenţial la luminozitatea imaginii. Un bun condensor este acromat şi are apertura numerică 1,4. O iluminare adecvată a preparatului presupune adaptarea aperturii numerice a condensorului la apertura numerică a obiectivului. Pentru aceasta condensorul dispune de o diafragmă iris, diafragma de apertură, manipu-

lată cu o pîrghie (18/fig.2-2). Dacă apertura numerică a condensorului o depăşeşte pe cea a obiectivului în microscop pătrunde lumină parazită care produce strălucirea aberantă a imaginii. Dacă apertura numerică a condensorului este redusă mult sub cea a obiectivului se pierd detalii ale imaginii (fig.2-5). Condensorul este fixat sub masa port-obiect printr-un suport care culisează pe verticală (2o/fig.2-2) acţionat de un buton (21/fig.2-2).

2.1.2.3.3. Condensorul pentru iluminarea cu fond negru. Examenul microscopic pe cîmp întunecat se bazează pe fenomenul Tyndall: într-o cameră obscură particulele de praf, care în condiţii de iluminare obişnuită rămîn invizibile, aflate în calea unei raze de lumină, care nu este direcţionată către ochiul observatorului (condiţie a obscurităţii), devin vizibile, prin lumina difractată şi reflectată difuz pe suprafaţa lor, şi materializează astfel traiectoria acestei raze. Funcţia condensorului pentru cîmp întunecat este de a opri razele de lumină directe să pătrundă în obiectiv (crearea fondului întunecat) şi de a ilumina oblic obiectul. O parte din razele difractate şi reflectate de către obiectul iluminat oblic pătrund în obiectiv şi formează imaginea luminoasă a obiectului pe fondul negru al cîmpului. Un astfel de condensor este, de exemplu, condensorul cu oglinzi sferice concentrice. In fig.2-1o este schematizat drumul razelor de lumină într-un asemenea condensor. La examenul microscopic pe fond negru obiectul flotează într-o peliculă de lichid pentru a evita reflexia totală a razelor înainte ca acestea să ajungă a-l lumina.

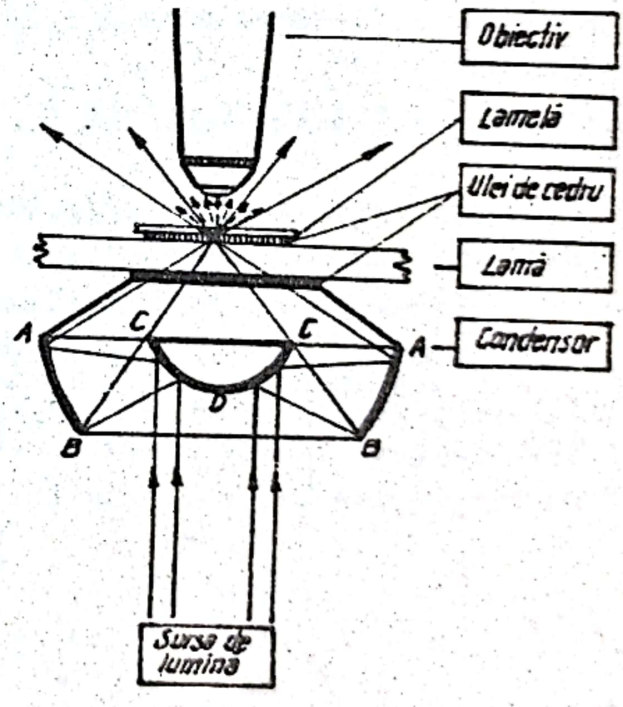


Fig.2-1o Condensorul cu oglinzi sferice concentrice pentru iluminarea cu fond întunecat

Alte detalii privind construcţia, echiparea şi funcţionalitatea microscopului depăşesc necesităţile lucrărilor practice curente de microbiologie. Ele pot fi găsite în Cartea tehnică a microscopului de laborator ML-4M furnizată odată cu aparatul de către Intreprinderea Optică Română.

2.2.

2.2. Examenul microscopic: identificarea microscopică a microbilor

Microbii (bacterii, fungi, protozoare) se urmăresc în produse patologice şi în culturi, fie în stare vie (preparate umede, necolorate), fie după prealabilă fixare şi colorare (preparate colorate).

2.2.1. Preparate microscopice necolorate (umede)

Citoplasma este incoloră şi are un indice de refracţie puţin diferit de al mediului de suspensie microbiană. Din această cauză în preparate umede microbii devin vizibili numai în condiţii speciale de iluminare: (i) reducerea diafragmei de apertură, (ii) examen pe fond negru, (iii) microscopie în contrast de fază. Ultimile 2 metode sînt cele care oferă, prin contrastul mai mare cu fondul cîmpului, mai multe detalii ale obiectului examinat. Preparatele umede se examinează pentru depistarea rapidă şi studiul morfologic al spirochetelor şi fungilor. Examinarea acestor preparate este de asemenea o metodă rapidă pentru observarea mobilităţii microbilor.

2.2.1.1. Examenul între lamă şi lamelă la microscopul cu cîmp luminos

- pe o lamă de microscop curată se depune cu ansa spiralată o picătură din suspensia microbiană de cercetat;

Fig.2-11 Efectuarea preparatului microscopic între lamă şi lamelă

- picătura se acoperă cu o lamelă curată ale cărei margini au fost unse în prealabil cu ulei de parafină pentru a evita evapora-

Scanned with OKEN Scanner

rea lichidului în cursul examenului (fig.2-11);

- se aşează preparatul pe masa orizontală a microscopului;
- se aduce obiectivul 40x în axul microscopului şi, privind lateral, se coboară tubul cu atenţie pînă cînd lentila frontală a obiectivului ajunge în imediata vecinătate a lamelei;
- se priveşte prin ocular şi
- dacă se foloseşte un microscop cu sursă de lumină exterioară, se centrează lumina cu ajutorul oglinzii (faţa concavă cînd utilizăm sursă de lumină artificială sau cea plană cînd examinăm la lumina solară);
- se prinde imaginea manipulînd încet tubul microscopului în sus prin butonul mişcării grosiere;
- se coboară condensorul sau se închide diafragma de apertură pînă cînd obţinem cel mai convenabil contrast;
- se pune la punct imaginea manipulînd butonul mişcării fine;
- după examinare preparatul se depune într-un recipient cu soluţie dezinfectantă.

2.2.1.2. <u>Microscopia cu fond negru</u>, examenul de elecţie pentru depistarea rapidă a spirochetelor

- se înlocuieşte condensorul de cîmp luminos cu cel pentru iluminarea cu fond negru;
- se depune pe lentila superioară a condensorului o picătură de ulei de cedru şi se coboară uşor condensorul;
- se pune preparatul între lamă şi lamelă (fig.2-11) pe masa orizontală a microscopului, după ce în prealabil s-a depus o picătură de ulei de cedru pe faţa inferioară a lamei. Lamele utilizate pentru microscopia cu fond negru trebuie să aibă o grosime de 1,0-1,1 mm pentru a situa preparatul în focarul condensorului (distanţa focală 1,2 mm).
- Se ridică uşor condensorul pentru a face contactul celor 2 picături de ulei de cedru (se evită astfel apariţia bulelor de aer în pelicula de ulei);
- se examinează preparatul cu un obiectiv uscat puternic. Cu cît apertura numerică a obiectivului este mai mare cu atît cîmpul apare mai puţin întunecat din cauza razelor directe care pătrund în obiectiv. De aceea, la examenul cu fond negru obiectivele cu imersie pot fi utilizate numai dacă sînt prevăzute cu diafragmă pentru reducerea aperturii numerice (condiţie în care scade şi puterea de rezoluţie).

Scanned with OKEN Scanner

- După examinare preparatul se depune în recipientul cu soluţie dezinfectantă.

2.2.2. Preparate microscopice colorate

2.2.2.1. Efectuarea frotiului

Prin frotiu se înţelege materialul microbian (produs patologic, cultură microbiană) etalat în strat subţire pe suprafaţa unei lame de microscop în vederea examenului microscopic.

Pentru efectuarea frotiurilor se folosesc lame de microscop curate şi degresate care se marchează, la una din extremităţi, cu indicativul materialului microbian ce urmează a fi etalat. Efectuarea unui frotiu cuprinde 3 timpi (fig.2-12):

- E t a l a r e a. O ansă din produsul patologic sau cultură bacteriană în mediu lichid este întinsă în strat cît mai subţire şi uniform pe o suprafaţă de 1-2 cmp în centrul lamei, fără a atinge marginile. Similar, o secţiune dintr-o colonie bacteriană pe mediu solid, prelevată cu acul, poate fi suspensionată într-o picătură de soluţie salină izotonă depusă în centrul lamei. In cursul etalării ansa şi acul se manipulează cu mişcări lente evitînd ruperea peliculei de lichid prin ridicarea bruscă a ansei. Aceasta previne formarea aerosolilor contaminanţi.

Cu fragmentele de ţesuturi se efectuează amprente: pe suprafaţa de secţiune a ţesutului se aplică lama în aşa fel încît în porţiunea ei centrală să rămînă amprenta ţesutului. Alternativ, frotiul se poate efectua prin ştergerea lamei cu suprafaţa de secţiune a ţesutului sau prin zdrobirea între 2 lame a unor formaţiuni granulare prezente în puroi sau în spută.

- U s c a r e a frotiului se face la temperatura camerei.

- F i x a r e a prin căldură. Lama cu frotiul uscat în sus se înfierbîntă trecînd-o de cîteva ori prin flacăra unui bec de gaz. Temperatura de fixare nu trebuie să fie prea ridicată pentru a nu distorsiona structurile celulare. Timpul de menţinere în flacără nu trebuie să depăşească 5-lo secunde, lama nu trebuie să frigă atunci cînd atingem cu ea dosul mîinii.

2.2.2.2. Metode de colorare

Colorarea frotiurilor are drept scop realizarea unui contrast mai bun între microbi şi fondul preparatului decît cel realizat în preparatele umede. Aceasta face mai net vizibile detalii morfologice.

Scanned with OKEN Scanner

Coloranţii uzuali în bacteriologie sînt coloranţi bazici (săruri ale unei baze colorate cu un acid incolor) derivaţi de pararozanilină (violetul de metil, fucsina bazică ş.a.) sau thionină (albastrul de metilen) caracterizaţi prin afinitatea lor pentru structurile acide atît de bogat reprezentate în celula bacteriană (acizii nucleici).

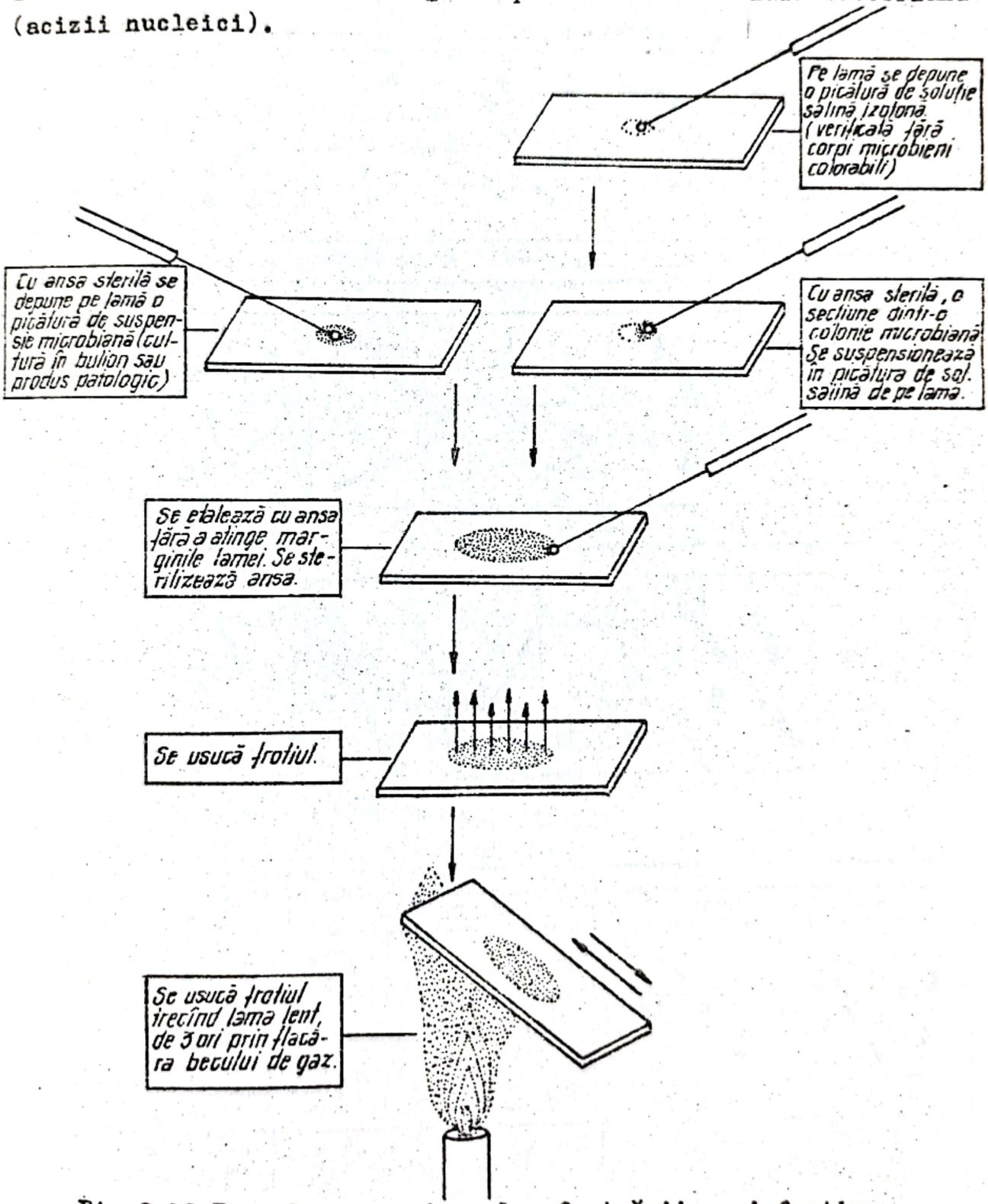


Fig.2-12 Etapele succesive ale efectuării unui frotiu

Distingem: coloraţii simple, coloraţii diferenţiale şi coloraţii speciale pentru structuri particulare ale unor bacterii (capsulă, granulaţii metacromatice, flageli, spori).

2.2.2.2.1. Coloraţiile simple utilizează un singur colorant şi evidenţiază numai morfologia microbilor (dimensiune, formă, gruparea celulelor, prezenţa sporilor, a capsulei) (fig.2-13). Uzua-

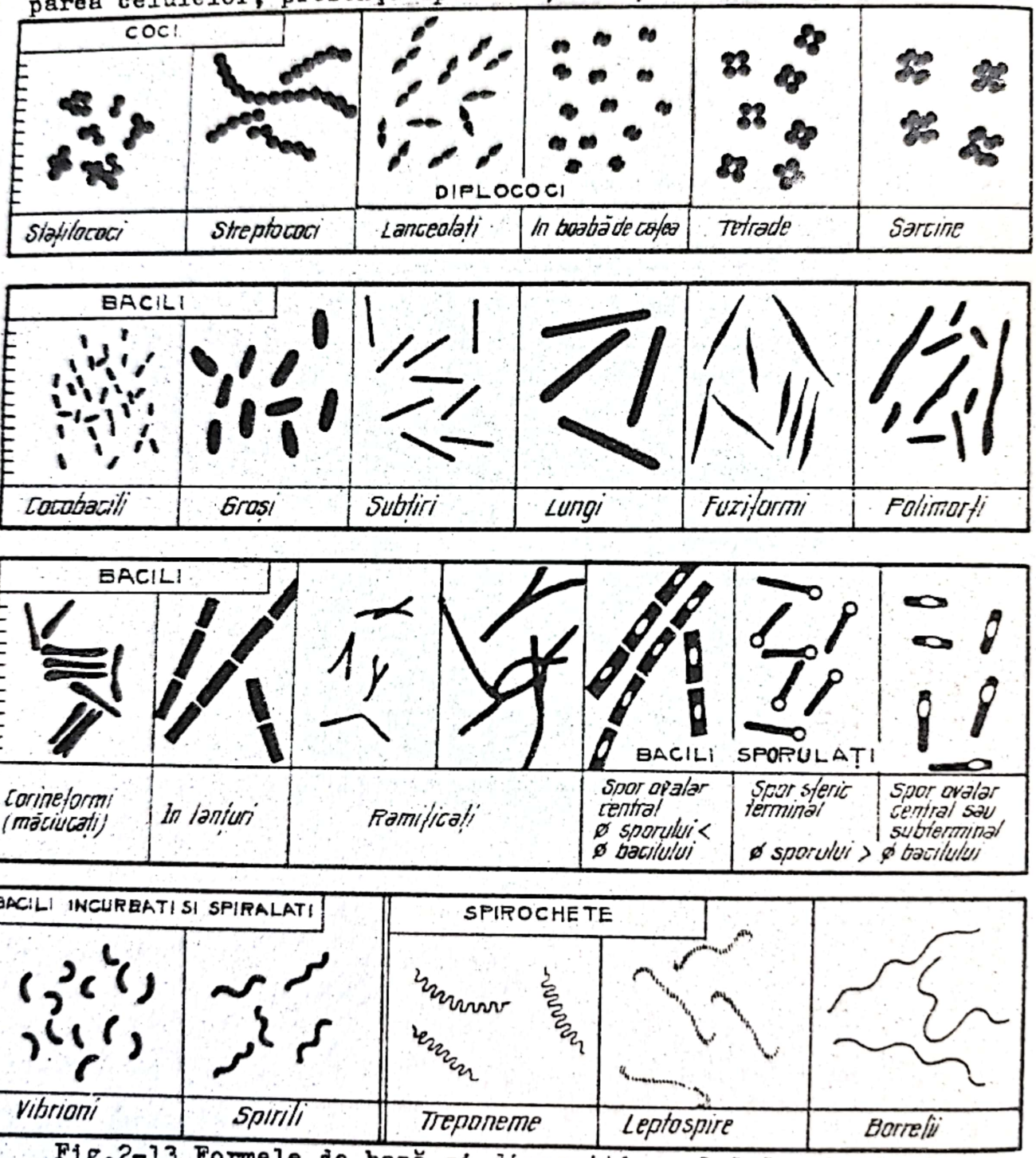


Fig.2-13 Formele de bază şi dispoziţia celulelor bacteriene. Scara: o diviziune de pe latura stîngă a cadrului = 1 µm

lă este coloraţia cu albastru de metilen: frotiul se acopere cu soluţie de albastru de metilen (→anexa II). Se menţine 30-60 secunde. Se spală cu apă de robinet. Se usucă şi se examinează cu imersia. Toate celulele (bacterii, leucocite ş.a.) apar colorate în albastru. Unele structuri bacteriene se pot colora metacromatic în roz (capsula la Bacillus anthracis) sau roşu (granulaţiile metacromatice ale bacilului difteric).

2.2.2.2.2. Coloraţiile diferenţiale evidenţiază în afară de caracterele morfologice şi reacţiile de culoare ale microbilor. Coloraţia Gram şi coloraţia Ziehl-Neelsen sînt cele mai uzuale coloraţii în bacteriologie.

Reacţiile de culoare (sau afinitatea tinctorială) ale bacteriilor sînt condiţionate de diferenţe de structură şi compoziţie chimică ale pereţilor bacterieni.

Pe baza afinităţii tinctoriale coloraţia Gram împarte bacteriile în gram-pozitive şi gram-negative iar coloraţia Ziehl-Neelsen în acido-alcoolo-rezistente şi neacido-alcoolo-rezistente.

Examenul microscopic al preparatelor colorate, mai ales a celor colorate diferenţial, este metoda uzuală de identificare a categoriilor microscopice ale bacteriilor, prima etapă de identificare a unei bacterii necunoscute (fig.2-13 şi tabelul 2-1).

(i) Coloraţia Gram

Unele bacterii sînt capabile, în prezenţa iodului, să „fixeze" coloranţii violeţi de pararozanilină (cristal violet, violet de metil) şi rezistă la acţiunea decolorantă a alcoolului sau acetonei rămînînd colorate în violet. Alte bacterii nu realizează acestă fixare, se decolorează sub acţiunea alcoolului sau acetonei şi pentru a le observa la microscop trebuie să le recolorăm. Dacă recolorarea o facem cu un colorant diferit (de exemplu, fucsină bazică, safranină ş.a.) realizăm diferenţierea microscopică facilă a celor 2 categorii de bacterii:

- bacteriile gram-pozitive, cele care rezistă la acţiunea decolorantului şi păstrează culoarea violetă;
- bacteriile gram-negative, cele care se decolorează şi necesită a fi recolorate.

Comportarea diferită a bacteriilor în coloraţia Gram ţine de diferenţele în structura peretelui bacterian: bacteriile gram-pozitive au un perete mai gros, constituit aproape exclusiv din pep-

Scanned with OKEN Scanner

tidoglican, în timp ce peretele bacteriilor gram-negative este mai subţire şi prevăzut cu o membrană externă lipopolizaharidică. Se consideră că solvirea învelişului lipidic prin alcool sau acetonă poate fi responsabilă de spălarea complexului colorant violet-iod. O explicaţie alternativă poate fi impermeabilizarea, prin acţiunea deshidratantă a alcoolului şi acetonei, a reţelei mai groase de peptidoglican a bacteriilor gram-pozitive.

Soluţii colorante şi reactivi necesari (→ anexa II):
- violet de metil soluţie apoasă o,2%,
- soluţie Lugol,
- amestec alcool-acetonă,
- fucsină Ziehl diluată 1/1o

Tehnica coloraţiei Gram:

Colorarea. Frotiul se acoperă cu soluţia de violet de metil Se menţine 1 minut. Se spală cu apă de robinet.

Mordanţarea. Frotiul se acoperă cu soluţia Lugol care după cîteva secunde se varsă. Se acoperă din nou cu soluţie Lugol care se menţine 2 minute. Se varsă şi fără a se spăla se trece la timpul următor.

Diferenţierea (decolorarea). Se acoperă frotiul cu amestecul alcool-acetonă şi se dau uşoare mişcări de înclinare lamei. Decolorarea se continuă pînă cînd în amestecul decolorant nu mai trec urme vizibile de colorant (cca 5-1o secunde pentru frotiurile din culturi microbiene, 1o-15 secunde, în raport cu grosimea frotiului, în cazul celor din produse patologice); în acest moment se spală frotiul cu apă de robinet.

Recolorarea. Frotiul se acoperă cu soluţia de fucsină Ziehl diluată 1/1o. Se menţine 3o secunde. Se spală cu apă de robinet. Se usucă şi se examinează la microscop cu imersia.

Bacteriile gram-pozitive apar colorate în violet iar cele gram-negative în roşu. Leucocitele şi celulele tisulare apar cu citoplasma colorată în roz iar nucleul în roşu.

Controlul coloraţiei Gram. Diferenţierea corectă între caracterul gram-pozitiv şi gram-negativ este esenţială pentru identificarea corectă a categoriei microscopice a bacteriilor, etapă importantă atît prin consecinţele pe care le are în orientarea investigaţiilor necesare identificării speciei cît şi pentru orientarea rapidă a antibioterapiei (→capitolele 6 şi 8).

Scanned with OKEN Scanner

Pentru fiecare lot de frotiuri se colorează în aceleaşi condiţii şi se examinează un frotiu martor. Frotiul martor se efectuează din amestecul unor suspensii de Escherichia coli şi Staphylococcus aureus în faza logaritmică de multiplicare (culturi de 12-18 ore pe geloză nutritivă la 37°C) omorîte prin autoclavare. Pe frotiul martor diferenţa între bacilii gram-negativi şi cocii gram-pozitivi trebuie să fie netă.

Pe frotiurile din produs patologic se verifică în primul rînd culoarea leucocitelor sau celulelor tisulare. Dacă acestea sînt violete diferenţierea a fost insuficientă. Dacă alături de leucocitele roşii apar bacterii violete diferenţierea a fost bună. Nu mai avem această certitudine cînd alături de leucocitele roşii nu vedem bacterii violete ci numai roşii. In acest ultim caz trebuie să examinăm şi frotiul martor.

Coloraţia Ziehl-Neelsen

Mycobacteriile, spre deosebire de toate celelalte bacterii, datorită prezenţei în peretele bacterian a unor substanţe ceroase, se colorează la cald cu fucsină bazică şi rezistă la decolorarea cu acizi minerali diluaţi şi cu alcool.

Soluţii colorante şi reactivi necesari (⟶ anexa II):
- fucsină fenicată Ziehl,
- soluţie alcool-clorhidric,
- albastru de metilen Loeffler

Tehnica coloraţiei Ziehl-Neelsen:

Colorarea. Lama cu frotiul fixat se aşează pe stativul de colorare şi se acoperă cu soluţia de fucsină Ziehl. Se încălzeşte lama cu ajutorul lămpii de spirt pînă la emitere de vapori (fără ca soluţia de fucsină să ajungă la fierbere). Se menţine 3-5 minute la această temperatură reîncălzind din cînd în cînd. După ce s-a răcit, lama se spală abundent cu apă de robinet.

Decolorarea. Se acoperă frotiul cu soluţie de alcool-clorhidric şi se decolorează pînă cînd nu mai apar urme de colorant în soluţia decolorantă. In final frotiul trebuie să rămînă, după spălare cu apă de robinet, alburiu.

Recolorarea. Frotiul se acoperă cu soluţie de albastru de metilen Loeffler pentru 3o secunde. Se spală cu apă de robinet. Se usucă şi se examinează la microscop cu imersia.

Scanned with OKEN Scanner

Bacilii acido-alcoolo-rezistenţi apar coloraţi în roşu. Bacteriile neacido-rezistente apar colorate în albastru la fel cu leucocitele şi celulele tisulare a căror citoplasmă se colorează în albastru deschis iar nucleul în albastru închis.

Controlul coloraţiei Ziehl-Neelsen se face prin colorarea şi examinarea unui frotiu dintr-o suspensie de micobacterii omorîte.

2.2.2.3. Examenul microscopic cu imersia

- Se depune o picătură de ulei de cedru pe frotiul colorat.
- Se fixează lama pe masa microscopului astfel încît frotiul cu picătura de ulei de cedru să fie pe deschiderea acesteia.
- Se aduce în axul optic al microscopului obiectivul cu imersie prin rotirea capului revolver.
- Se ridică condensorul la maximum iar diafragma de apertură se deschide la maximum.
- Privind lateral, se coboară cu atenţie tubul microscopului manipulînd butonul mişcării grosiere pînă cînd lentila frontală face contact cu picătura de ulei de cedru şi ajunge în imediata vecinătate a lamei.
- Dacă microscopul are sursă de lumină exterioară, privind prin ocular se centrează lumina cu ajutorul oglinzii concave.
- Se prinde imaginea manipulînd cu atenţie de jos în sus tubul microscopului prin butonul mişcării grosiere.
- Se pune la punct imaginea manipulînd butonul mişcării fine, care nu se manipulează decît cca 2 rotaţii înainte sau înapoi (→2.1.2.1.).

La terminarea examenului:

- Se ridică tubul microscopului cu 1-2 cm.
- Se dă jos preparatul de pe masa microscopului.
- Se îndepărtează complet uleiul de cedru de pe lentila frontală a obiectivului prin ştergere cu pulpa degetului. Se şterge imediat degetul cu un tifon.
- Se roteşte revolverul pentru a scoate obiectivul cu imersie din axul optic al microscopului.
- Se pune microscopul la adăpost de praf (sub husă sau în cutie).

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 2-1

Principalele categorii de identificare microscopică a bacteriilor

Caractere morfologice	Reacţia de culoare	Categoria microscopică
Coci sferici în grămezi	gram-pozitivi	stafilococi
Coci sferici sau ovalari în lanţuri	gram-pozitivi	streptococi
Diplococi lanceolaţi, eventual capsulaţi	gram-pozitivi	pneumococi
Diplococi în boabe de cafea	gram-negativi	neisserii
Bacili	gram-negativi	enterobacteriacee, Pseudomonas ş.a.
Bacili şi cocobacili polimorfi	gram-negativi	Bacteroides, Haemophilus
Vibrioni, spirili	gram-negativi	Vibrio, Campylobacter, Spirillum
Bacili măciucaţi, în palisade şi unghiuri	gram-pozitivi la limită, eventual granulari	bacili difteroizi (corinebacterii)
Bacili mari cu capete retezate, eventual în lanţuri, cu spor ovalar, central cu Ø<Ø bacilului	gram-pozitivi	bacili antracoizi
Bacili sporulaţi cu spor sferic sau ovalar cu Ø>Ø bacilului	gram-pozitivi sau gram-variabil.)	clostridii
Bacili fini, eventual ramificaţi	acido-rezistenţi	mycobacterii
Spirochete	uzual depistate la microscopul cu fond negru rar pe frotiul Gram (gram-negative) sau Giemsa	Treponema, Leptospira, Borrelia; treponeme comensale, Borrelia

.) In faza logaritmică a culturii: gram-pozitivi, în faza staţionară: gram-negativi; fenomenul este observat frecvent la bacilul tetanic (formele sporulate sînt gram-negative).

BIBLIOGRAFIE

Bartlett R.C., Tetrault J., Evers J., Officer J., Derench J. (1979): Quality assurance of Gram-stained direct smears. Am.J.Clin.Pathol. 72:984.

Bogdănescu V., Iacob L., Martinaş O. (1981): Studiul comparativ asupra utilizării alcool-acidului clorhidric şi a acidului sulfuric în coloraţia Ziehl-Neelsen. Pneumoftiziologia 3o:157.

Hunter P. (1977): General microbiology (The student's textbook), C.V. Mosby Company, St.Louis, pp. 87-122.

Intreprinderea Optică Română (1981): Cartea tehnică - microscop de laborator ML-4M, Bucureşti.

Ministerul Sănătăţii (1977): Buletinul Ministerului Sănătăţii, 2:87.

Sprössig M., Anger G. (1976): Mikrobiologisches Vademekum, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, pp. 99-lol.

Scanned with OKEN Scanner

3. CULTIVAREA SI STUDIUL CARACTERELOR FIZIOLOGICE ALE BACTERIILOR

DUMITRU T. BUIUC şi VIORICA I. PETREANU

Bacterii aparţinînd unor specii diferite pot avea caractere microscopice asemănătoare. De aceea identificarea bacteriilor presupune şi studiul caracterelor lor fiziologice. Acestea sînt cercetate pe culturi obţinute prin creşterea bacteriilor *in vitro* pe medii de cultură.

Dacă în proba studiată coexistă mai multe feluri de bacterii, în scopul identificării lor, este necesară izolarea prealabilă a fiecărei bacterii în cultură pură. Cultivarea permite de asemenea depistarea bacteriilor într-un produs patologic atunci cînd numărul lor este prea mic pentru a putea fi văzute la microscop.

Se impun cunoscute 2 operaţii distincte:

- prepararea unor medii de cultură adecvate,
- izolarea în cultură pură a microbilor.

3.1. Mediile de cultură

Mediile de cultură trebuie să permită multiplicarea bacteriilor şi manifestarea proprietăţilor lor biologice caracteristice. Pentru aceasta trebuie să posede următoarele calităţi:

- să fie nutritive,
- să îndeplinească condiţiile fizico-chimice de osmolaritate, pH, potenţial de oxido-reducere optime pentru dezvoltarea bacteriilor,
- să permită urmărirea facilă a dezvoltării microbiene şi a tuturor modificărilor legate de aceasta: mediile lichide trebuie să fie perfect clare - numai astfel permit a surprinde opacifierea legată de apariţia şi dezvoltarea culturii bacteriene -; mediile solide trebuie să aibă suprafaţa plană şi lucioasă - numai astfel permit observarea apariţiei şi dezvoltării coloniilor bacteriene, care uneori au dimensiuni foarte reduse,
- să fie sterile.

3.1.1. Clasificarea mediilor de cultură

3.1.1.1. Medii empirice şi medii sintetice. Mediile usuale pentru cultivarea bacteriilor au la bază extractul apos de carne, cord,

3.1.

creier sau ficat ale cărui principii nutritive (hidrocarbonate, baze azotate, săruri minerale, unii factori de creştere ş.a.) sînt completate cu aminoacizii şi peptidele din diferite sorturi de peptonă (produşi de hidroliză enzimatică ai proteinelor animale sau vegetale). Aceste medii, care se bazează pe ingrediente de origine animală sau vegetală, sînt <u>medii empirice</u>. Dacă osmolaritatea, pH-ul şi potenţialul lor de oxido-reducere pot fi riguros controlate, compoziţia lor în principii nutritive poate fi controlată numai în anumite limite.

<u>Mediile sintetice</u> sînt soluţii tamponate de săruri minerale incluzînd o sare de amoniu şi un substrat carbonat simplu. Toate ingredientele folosite, inclusiv factorii de creştere, sînt substanţe chimic pure. Asemenea medii cu compoziţie minimală, riguros controlată, sînt folosite pentru studiul necesităţilor nutritive ale bacteriilor şi al metabolismului bacterian.

3.1.1.2. <u>Clasificarea după consistenţă</u>

(i) <u>Medii lichide</u> (bulion nutritiv ş.a.). In medii lichide bacteriile cultivă amestecate unele cu altele. Pentru aceste motive mediile lichide sînt folosite numai la

- izolarea bacteriilor din unele produse patologice monobacteriene (sînge, l.c.r. ş.a.),
- studiul caracterelor biochimice ale bacteriilor izolate în cultură pură.

In vederea utilizării, mediile de cultură lichide sînt repartizate în eprubete sau în baloane (fig.3-1).

(ii) <u>Mediile solide</u> uzual sînt obţinute prin gelificarea mediilor lichide cu un fitocoloid polizaharidic extras din anumite alge marine, agarul (mediul de cultură corespunzător este agarul nutritiv). Medii solide mai pot fi obţinute prin coagularea termică a proteinelor din serul sanguin sau ou.

Pe suprafaţa sau în profunzimea mediilor solide, datorită vîscozităţii lor, bacteriile inoculate rămîn fixate şi cultivă sub formă de colonii. <u>Colonia</u> este o acumulare locală de bacterii descendente dintr-un singur individ sau un număr limitat de indivizi foarte apropiaţi (unitatea formatoare de colonii). Această populaţie bacteriană are caractere genetice comune şi constituie o clonă.

Aspectul coloniilor poate fi deosebit de la o bacterie la alta. Mediile de cultură solide se folosesc în primul rînd pentru

● izolarea în cultură pură a bacteriilor din produse pluri-bacteriene;

● studiul caracterelor de cultură ale bacteriilor.

In vederea utilizării, mediile de cultură solide sînt repartizate în plăci Petri, în eprubete cu solidificare în pantă (fig.3-1).

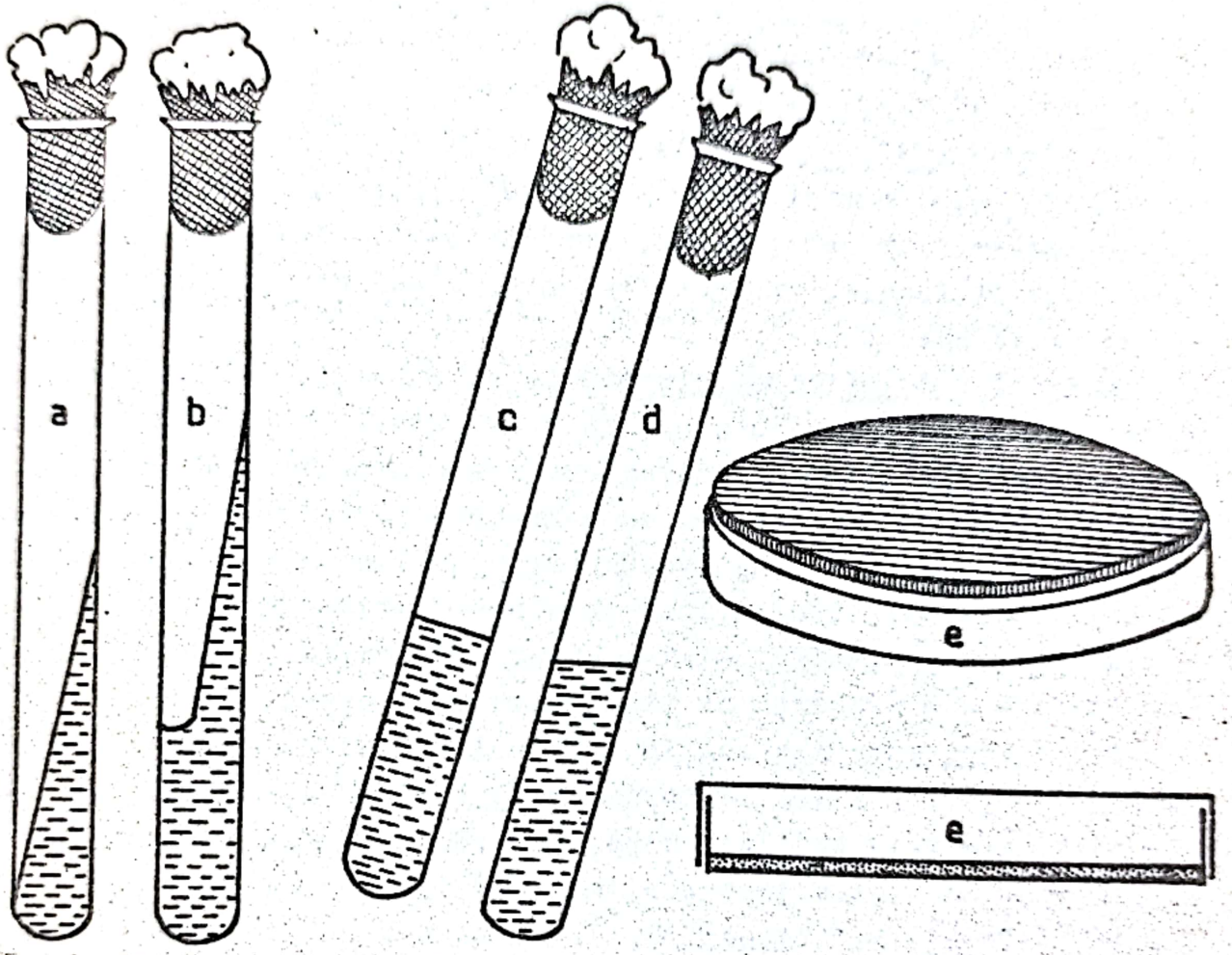


Fig.3-1 Diferite modalităţi de repartizare a mediilor de cultură: (a) agar nutritiv repartizat în pantă; (b) idem în coloană şi pantă; (c) idem în coloană; (d) mediu lichid în tub; (e) agar nutritiv repartizat în placă Petri

(iii) Medii semisolide (agarul moale) sînt obţinute prin gelifiarea bulionului nutritiv cu o cantitate mai redusă de agar (5‰ în mediile semisolide faţă de 2o‰ în cele solide). Sînt folosite pentru studiul mobilităţii bacteriilor şi a unor caractere biochimice. Pentru utilizare se repartizează în coloană în eprubete (fig.3-1).

3.1.1.3. Clasificarea după compoziţie

(i) Mediile simple sau mediile de bază (bulionul nutritiv,

3.1.

agar nutritiv) permit cultivarea unui număr apreciabil de bacterii Conţin numai ingredientele de bază: extractul de carne, peptonă, clorură de sodiu.

(ii) Medii îmbogăţite (bulion glucozat, bulion ser, agar sînge etc.). Sînt destinate cultivării unor bacterii pretenţioase nutritiv. Se obţin prin adăugarea de sînge, lichid de ascită, ser, extract de levură (aport de factori de creştere) sau zaharuri (glucoză) la mediile de bază.

(iii) Medii speciale

- Medii de izolare. Izolarea microbilor se poate face pe orice mediu solid satisfăcător nutritiv. Pentru a facilita însă izolarea microbilor patogeni din produse patologice hipercontaminate (materii fecale, exsudat faringian etc.) se utilizează o serie de medii speciale:

● Mediile de diferenţiere conţin substratul pentru o enzimă bacteriană caracteristică şi un indicator care evidenţiază atacarea acestui substrat. Evidenţiază deci un caracter metabolic care diferenţiază între ei microbi cu caractere de cultură şi morfologice identice. De exemplu, mediul Drigalski (agar nutritiv lactozat şi turnesolat) diferenţiază enterobacteriile lactozo-pozitive de cele lactozo-negative. Agarul sînge diferenţiază bacteriile după absenţa sau prezenţa şi tipul hemolizei produse.

● Mediile selective conţin substanţe cu acţiune inhibitorie pentru dezvoltarea altor bacterii decît acelea a căror izolare se urmăreşte. Pentru a facilita reperarea coloniilor unei anumite bacterii, mediile selective conţin ingrediente care le imprimă şi caracterul de mediu diferenţial.

Exemple de medii selective: medii cu telurit de potasiu pentru izolarea bacilului difteric din exsudatul faringian; mediul SS (agar nutritiv cu săruri biliare, verde brillant, citrat şi hiposulfit de sodiu şi adiţionat cu lactoză şi roşu neutru ca indicator) pentru izolarea shigellelor şi salmonellelor din materii fecale.

- Mediile de îmbogăţire (a nu se confunda cu mediile îmbogăţite) sînt medii lichide care favorizează înmulţirea anumitor bacterii patogene şi inhibă selectiv dezvoltarea florei de asociaţie dintr-un produs patologic. Însămînţarea şi incubarea în aceste medii este utilă ca etapă premergătoare însămînţării pe medii selective atunci cînd se urmăreşte izolarea unei bacterii patogene

care se află în număr redus în produse cu floră de asociaţie abundentă.

Exemple de medii de îmbogăţire: mediul Kauffmann-Müller (bulion nutritiv tetrationat) sau mediul cu selenit acid de sodiu inhibă flora coliformă în favoarea salmonellelor în probe de materii fecale.

- Medii de identificare. La un mediu nutritiv de bază se încorporează un ingredient care constituie substratul activităţii unei enzime bacteriene şi un indicator adecvat care evidenţiază modificarea substratului în cursul activităţii bacteriei cercetate. Baterii cu asemenea medii sînt folosite pentru identificarea bacteriilor.

3.2. Cultivarea şi izolarea bacteriilor în cultură pură

3.2.1. Însămînţarea şi izolarea bacteriilor în cultură pură

Însămînţarea = depunerea într-un mediu de cultură a materialului bacterian (produs patologic sau cultură), inoculum, în vederea cultivării bacteriilor.

Repicarea = însămînţarea într-un mediu de cultură proaspăt a unei bacterii dintr-o altă cultură.

Izolare = operaţia prin care o bacterie este obţinută în cultură pură.

Instrumentar folosit:

- Acul de însămînţare confecţionat din sîrmă inoxidabilă (platină sau crom-nichel) a cărei grosime depinde de consistenţa materialului microbian manipulat. Una din extremităţile firului este fixată într-o baghetă de sticlă sau de metal. Cealaltă extremitate poate fi dreaptă, în care caz se numeşte ac simplu şi se utilizează pentru repicarea coloniilor de dimensiuni mici, pentru însămînţările prin înţepare etc. Cînd firul se termină printr-o buclă (cu diametru variabil de la 1 la cîţiva mm) este numit ansă şi se utilizează pentru însămînţarea în medii lichide sau pentru însămînţarea prin epuizare pe suprafaţa mediilor solide. Din fire groase, turtite la capăt, se obţine spatula utilizată pentru manipularea coloniilor bacteriene cu o consistenţă deosebită (fig.3-2)

- Pipeta Pasteur este o pipetă capilară obţinută prin efilarea unui tub de sticlă (fig.1-8).

(i) Însămînţarea cu epuizarea inoculului pe suprafaţa mediului în plăci Petri, metoda de elecţie pentru izolarea bacteriilor

Fig.3-2 Acul de însămînţare: A-ac simplu, B-ansă, C-spatulă

din produse plurimicrobiene. Placa - cu suprafaţa mediului fără apă de condens (suprafaţa mediului „uscată" prin menţinerea plăcii cca 30 minute la termostat la 37°C cu capacul întredeschis) - se ţine pe masa de lucru. Cu mîna stîngă se întredeschide capacul. Ansa se ţine în mîna dreaptă ca un creion, oblic faţă de suprafaţa mediului (fig.3-3). Se apasă foarte uşor pentru a evita zgîrierea acestuia.

O mică porţiune din produsul bacterian este dispersată cu ajutorul ansei sau cu tamponul (dacă recoltarea probei de la pacient s-a făcut în acest mod) pe un sector limitat al plăcii. Se sterilizează ansa; se verifică temperatura prin atingerea mediului într-o zonă neînsămînţată. In continuare inoculum se epuizează în 4 cadrane descriind cu ansa striuri conform schemei din fig.3-4. In acest mod în ultimile cadrane de epuizare se obţin colonii izolate, bine individualizate (fig.3-4).

(ii) Însămînţarea pe suprafaţa mediilor solidificate în pantă. Respectînd condiţiile de asepsie, se introduce ansa cu inoculum în tubul cu mediu pînă deasupra lichidului de condens. Se retrage ansa descriind pe suprafaţa mediului, cu grijă pentru a nu-l zgîria, striuri în zigzag pentru dispersia inoculului. In acest mod se epuizează ansa pe mai multe tuburi. Pe suprafaţa mediului din ultimile tuburi se vor obcolonii izolate.

(iii) Însămînţarea prin înţepare în mediu semisolid repartizat în coloană se utilizează pentru cercetarea mobilităţii, a unor caractere biochimice, sau pentru conservarea bacteriilor în laborator. Se efectuează cu acul simplu.

(iv) Metode speciale de izolare se folosesc în următoarele cazuri:

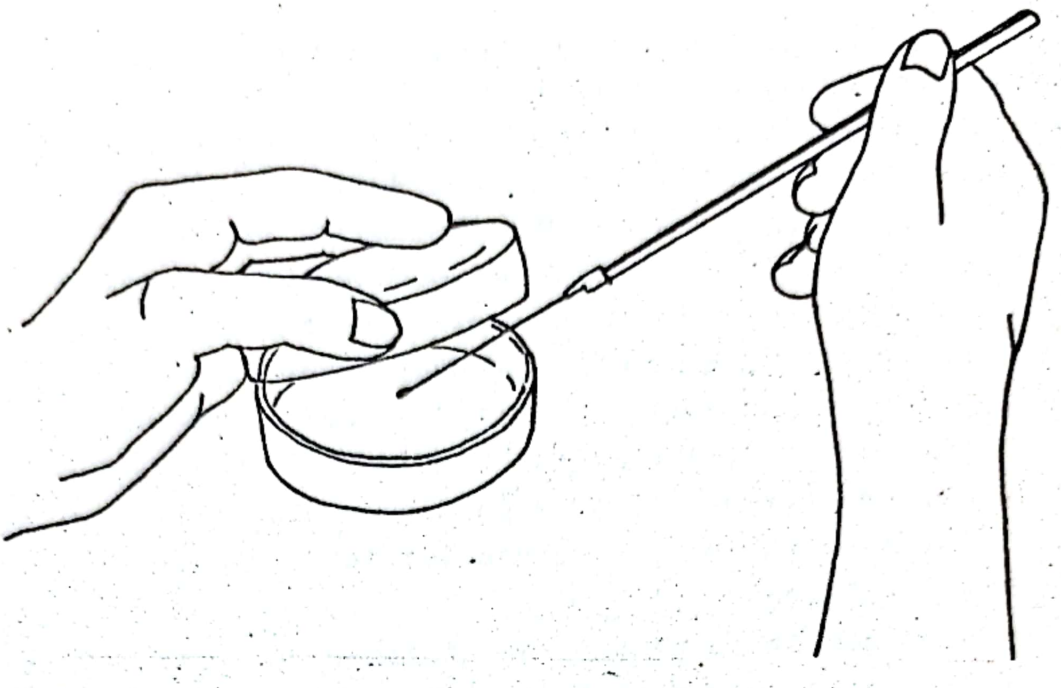


Fig.3-3 Insămînţarea cu ansa pe suprafaţa mediului în placă Petri

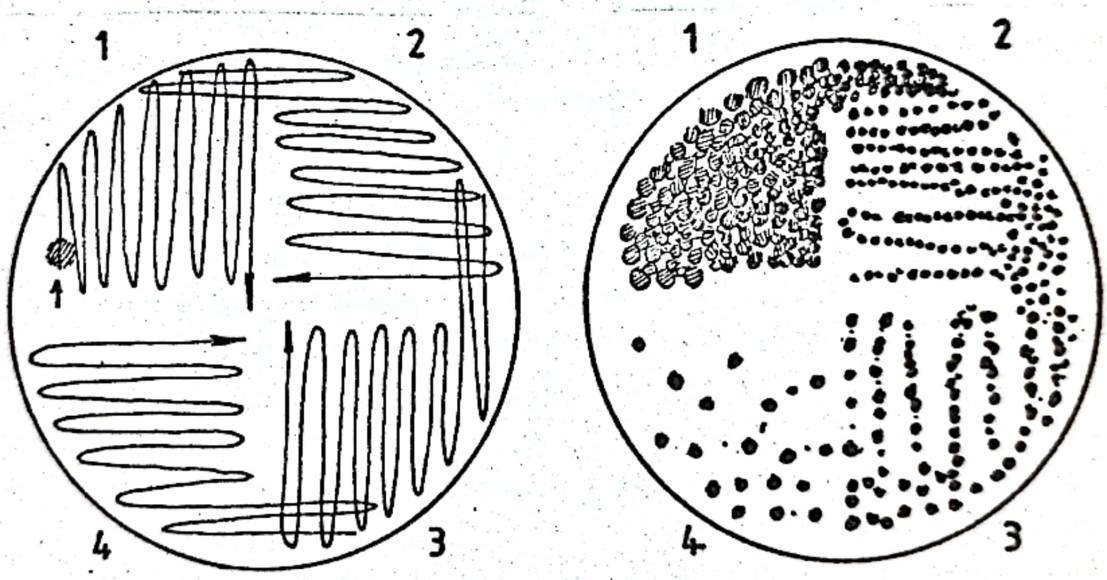


Fig.3-4 Schema de dispersie a inoculului în 4 cadrane succesive pe suprafaţa mediului repartizat în placă Petri (stînga). Dispersia coloniilor (dreapta). Această modalitate de dispersie oferă posibilitatea aprecierii semicantitative a creşterii: prezenţa a $\geqslant 5$ colonii de acelaşi tip se notează cu +++, ++ sau + după cum sînt situate în a 4-a, a 3-a sau primele două cadrane de epuizare

● Izolarea pe medii lichide se face exclusiv din produse monobacteriene în care bacteriile se află în număr mic, prea mic pentru a fi depistate microscopic sau izolate pe medii solide.

3.2.

Pentru izolare se procedează la însămînţarea unei cantităţi mari din produs (cîteva picături pînă la cîţiva ml).

● Izolarea bacteriilor sporulate de cele nesporulate pe baza termorezistenţei sporilor. Produsul în care sînt prezente bacterii sporulate este suspensionat în soluţie salină izotonă şi încălzit la baia de apă la 80°C timp de lo minute, după care se face izolarea prin epuizarea inoculului pe suprafaţa mediului solid.

● Izolarea prin însămînţări pe suprafaţa mediilor selective.

● Izolarea prin metode biologice se bazează pe sensibilitatea particulară, selectivă, a unor animale de laborator faţă de unele specii bacteriene (sensibilitatea particulară a şoarecelui pentru pneumococ sau a cobaiului pentru bacilul tuberculozei etc.).

3.2.2. Incubarea

Incubarea constă în menţinerea mediilor de cultură însămînţate în condiţii necesare dezvoltării culturii: condiţii de temperatură, raportul faţă de oxigen ş.a. La majoritatea speciilor bacteriene cultura apare după cca 18-24 ore de incubare la temperatura optimă de dezvoltare. La unele specii perioada de incubare necesară apariţiei culturii este mai lungă: de la cîteva zile pînă la cîteva săptămîni.

(a) Condiţiile de temperatură. Bacteriile patogene sînt organisme mezofile, majoritatea avînd temperatura optimă de dezvoltare cuprinsă între 30-37°C. Această temperatură constantă este asigurată prin menţinerea mediilor însămînţate în termostat - dulap sau încăpere termoizolată prevăzută cu sursă de încălzire (electrică) şi un sistem termoreglator.

(b) Raportul cu oxigenul. Bacteriile strict aerobe sînt cultivate în prezenţa aerului. Bacteriile strict anaerobe sînt cultivate la adăpost de oxigenul liber. Bacteriile facultativ anaerobe pot fi cultivate atît în prezenţa cît şi în absenţa oxigenului. Bacteriile microaerofile cultivă numai în prezenţa unei tensiuni parţiale scăzute a oxigenului. Unele bacterii necesită pentru dezvoltare o atmosferă cu 5-lo% CO_2 şi sînt cunoscute sub numele de bacterii carboxifile.

Majoritatea bacteriilor patogene sînt aerobe şi facultativ anaerobe; cultivarea lor nu impune condiţii speciale din acest punct de vedere: cultivă pe medii aerobe.

Cultivarea în anaerobioză. Indepărtarea oxigenului liber şi prezervarea culturii de contactul cu oxigenul atmosferic se obţin prin:

Scanned with OKEN Scanner

● „regenerarea" mediilor[1] repartizate în recipiente care asigură un contact redus cu aerul[2] şi prezervarea lor, după inoculare, de contactul cu aerul printr-un strat de ulei de parafină;

● adăugarea la medii a unor ingrediente cu activitate reducătoare (acid tioglicolic, carne uscată ş.a.);

● incubarea culturii în recipiente speciale (anaerostate) din care aerul poate fi îndepărtat şi înlocuit cu hidrogen.

In lipsa anaerostatului, într-o cutie Petri poate fi creată o incintă etanşă din care O_2 este îndepărtat prin reacţia cu pirogalolul în mediu alcalin[3] (fig.3-5).

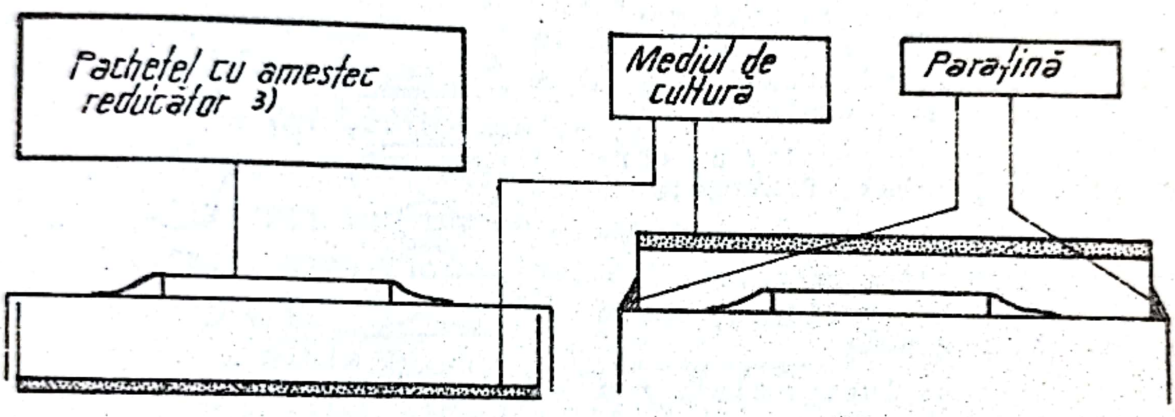


Fig.3-5 O modalitate simplă de formare a unei incinte anaerobe într-o cutie Petri

Cultivarea în atmosferă cu CO_2. Culturile sînt introduse în termostat într-un borcan închis. Dacă într-un asemenea borcan este lăsată să ardă o lumînare, cînd concentraţia CO_2 atinge 5-10%, luminarea se stinge.

3.3. Studiul caracterelor fiziologice ale bacteriilor

3.3.1. Cercetarea caracterelor de cultură

(i) Condiţiile optime de obţinere a culturii. Se reţin în acest cadru:

---

1) „Regenerare" = fierberea tuburilor cu mediu timp de 15 minute în baia de apă şi răcirea lor bruscă la curent de apă înaintea inoculării.

2) Tuburi Weinberg, tuburi cu mediu repartizat în coloană înaltă.

3) Un pachetel din hîrtie de filtru conţinînd pirogalol 0,4 g/ CO_3K_2 0,4 g/ talc 8 g este prins cu bandă adezivă de capacul cutiei conform schemei din fig.3-5.

3.3.

● necesităţile nutritive (cultivarea pe medii uzuale, simple sau numai pe medii îmbogăţite în anumiţi factori de creştere);

● cultivare lentă sau rapidă;

● raporturile cu oxigenul (cultivare în aerobioză, anaerobioză etc.).

(ii) Aspectul culturii. Aspectul culturii pe medii lichide prezintă prea puţine caractere distinctive pentru a putea fi utilizate cu folos în identificarea bacteriilor.

Aspectul coloniilor pe suprafaţa mediilor solide variază mai mult de la o specie bacteriană la alta fără a permite însă diferenţieri categorice. Se urmăresc (fig.3-6):

- dimensiunea: colonii mari (2-3 mm diametru), colonii mici (o,1-1 mm diametru), colonii mijlocii (1-2 mm diametru);
- conturul: circular cu margini întregi, lobat, fimbriat;
- relieful: plat, bombat, acuminat, papilat;
- suprafaţa: lucioasă, umedă sau uscată, rugoasă;
- culoarea: nepigmentate sau pigmentate;
- opacitatea: opace sau transparente;
- consistenţa: untoasă, mucoasă, friabilă, membranoasă;

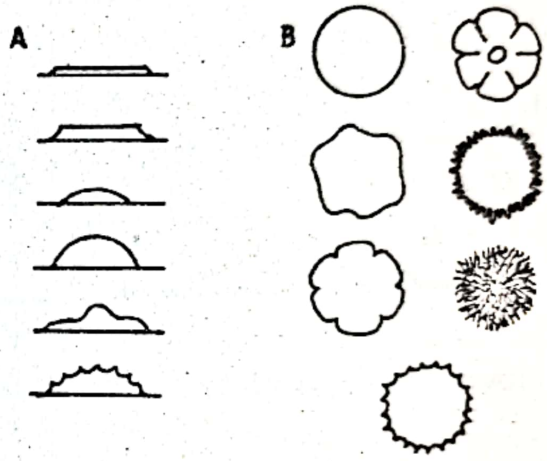


Fig.3-6 Relieful (A) şi conturul (B) coloniilor bacteriene

- aderenţa la mediu: neaderente sau puternic aderente de suprafaţa mediului;
- emulsionabilitatea în soluţie salină izotonă sau soluţie de tripaflavină 1/5oo: emulsionabile sau neemulsionabile.

Pe baza acestor caractere pot fi diferenţiate variantele de cultură S şi R.

Forma S (smouth=neted): colonii cu contur circular, regulat sau lobat, cu suprafaţa netedă, lucioasă şi umedă, uşor emulsionabile în soluţie salină izotonă ca şi în soluţia 1/5oo de tripaflavină.

Forma R (rough=rugos): colonii cu contur neregulat, crenelat sau fimbriat, cu suprafaţa rugoasă şi uscată, care nu pot fi emulsionate în soluţie salină izotonă sau soluţie 1/5oo de tripaflavină.

Majoritatea bacteriilor, cît timp posedă patogenitatea şi structura antigenică caracteristice, cultivă sub forma S. Trece-

rea acestor bacterii la forma R este legată de pierderea patogenităţii şi de o degradare a structurii antigenice. Numai un număr redus de bacterii se prezintă în mod normal în formă R: de exemplu, Mycobacterium tuberculosis.

3.3.2. Cercetarea activităţii biochimice

Fiecare unitate taxonomică bacteriană (gen, specie etc.) are un spectru propriu de activitate enzimatică. Studierea acestuia are o importanţă deosebită pentru identificarea bacteriilor. Activitatea enzimelor bacteriene este urmărită prin modificările pe care le produc asupra substratului corespunzător înglobat, de obicei, în mediu de cultură. Se urmăresc:

- activităţi enzimatice în cadrul metabolismului energetic şi catabolismului glucidic;
- activităţi enzimatice în cadrul catabolismului protidic;
- determinarea unor necesităţi nutritive şi substanţe donatoare de energie.

Redăm un minim de date tehnice necesare parcurgerii lucrărilor practice privind identificarea bacteriilor. Studenţii nu au obligaţia de a reţine datele tehnice: pentru lucrările respective şi le vor consemna în caietul de referate şi vor lucra cu caietul alături.

(1) Activităţi enzimatice în cadrul metabolismului energetic şi catabolismului glucidic

(i) Punerea în evidenţă a căilor principale ale metabolismului energetic. Diferenţierea între metabolizarea pe cale oxidativă (respiratorie) sau fermentativă a glucozei: bacteria este însămînţată prin înţepare în 2 tuburi cu mediu adecvat glucozat 1% şi cu un indicator de pH. Incubarea se face aerob şi anaerob. Dacă degradarea glucozei se face oxidativ, indicatorul virează numai în tubul incubat aerob. Dacă se face fermentativ, virajul apare în ambele tuburi (fig.3-7).

(ii) Evidenţierea sistemelor enzimatice respiratorii

Oxidaza. O bandă de hîrtie de filtru impregnată cu soluţie de tetrametilparafenilendiamină este aplicată pe o lamă de sticlă şi umezită cu apă distilată. Cultura bacteriei studiate (colonie izolată în cultură primară sau cultură pură pe mediu solid ori lichid) se aplică pe banda de hîrtie cu ansa de platină. Apariţia culorii albastre în 2o-3o secunde indică o reacţie pozitivă (oxidaza prezentă). Apariţia culorii albastre după 6o secunde nu se ia în consideraţie.

Catalaza. Intr-un tub de aglutinare se face o suspensie densă a culturii de examinat în volum de 1-2 ml soluţie salină izotonă. Se adaugă cîteva picături de apă oxigenată. Nu se agită. Apariţia în interval de 5 minute a unor bule de gaz indică o reacţie

3.3.

pozitivă. Nu se utilizează culturi provenite de pe medii cu sînge.

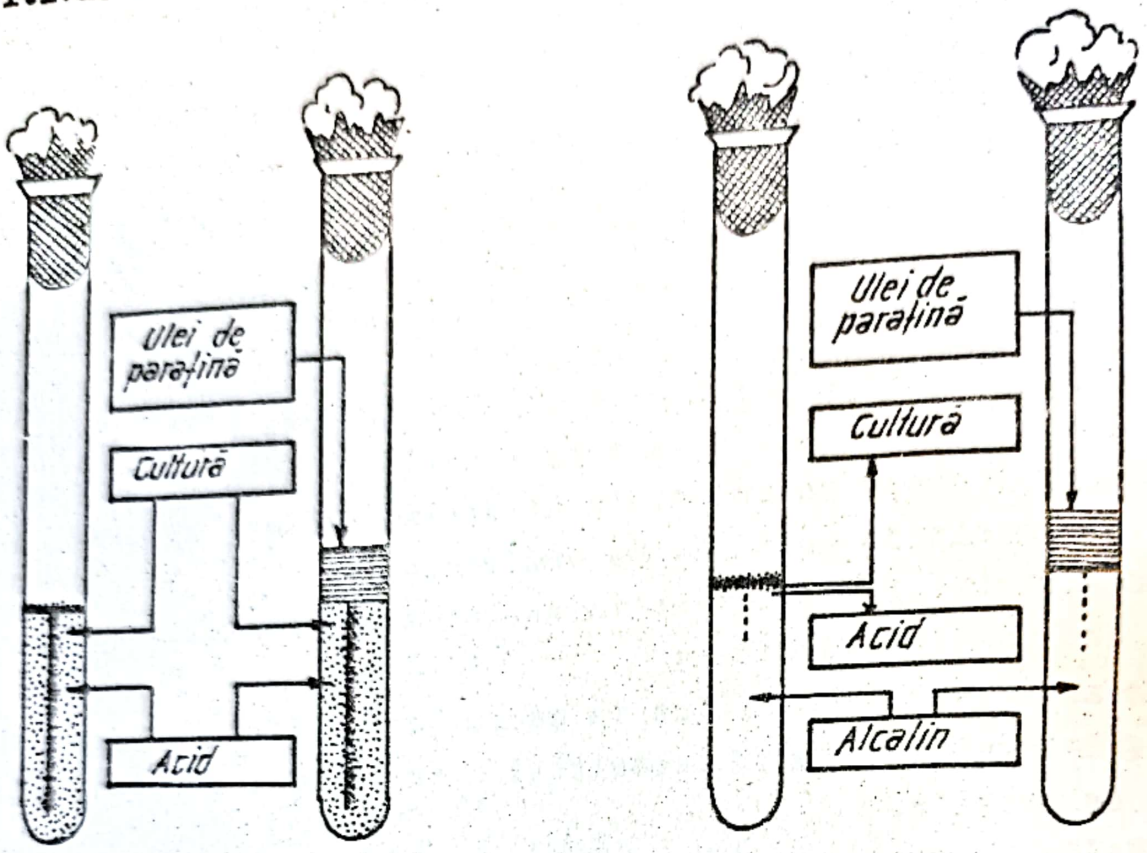


Fig.3-7 Proba de oxidare-fermentare
Bacteriile oxidative: produc o acidifiere redusă (CO_2, care rezultă din oxidările cu care este cuplată respiraţia) limitată la zona aerobă a tubului neparafinat. In tubul parafinat nici o modificare sau chiar lipsa culturii. Bacteriile oxidative sînt strict aerobe sau microaerofile.
Bacteriile fermentative: produc o acidifiere intensă (acumulare de acid lactic, acid formic etc.). Acidifierea mediului se produce în ambele tuburi.
Bacteriile fără acţiune asupra carbohidratului lasă mediul nemodificat sau îl alcalinizează.

(iii) Determinarea căii fermentative prezintă interes pentru identificarea bacteriilor din familia Enterobacteriaceae. La aceste organisme există 2 căi fermentative principale, calea acidă mixtă şi calea butilen-glicolică.

Bacteriile care folosesc calea acidă mixtă acidifică puternic mediu (pH sub 4,5) prin acumulare de cataboliţi finali acizi (glucoză → acid piruvic → alcool etilic, acid acetic, acid formic, acid lactic, acid succinic). Acidifierea este pusă în evidenţă prin reacţia la roşu metil.

Bacteriile care folosesc calea butilen-glicolică produc o acidifiere redusă şi tranzitorie a mediului, cantitatea totală de acizi formaţi fiind mult mai mică decît în primul caz (glucoză → acid piruvic → acetilmetilcarbinol → butilen-glicol). Acetilmetilcarbinolul este pus în evidenţă prin reacţia Voges-Proskauer (mediul Clark-Lubs). După 24-48 ore de incubare la 37°C, se adaugă 2 picături din soluţia indicator de roşu metil. Reacţie pozitivă (bacteria cercetată fermentează glucoza pe calea acidă mixtă)

pozitivă. Nu se utilizează culturi provenite de pe medii cu sînge.

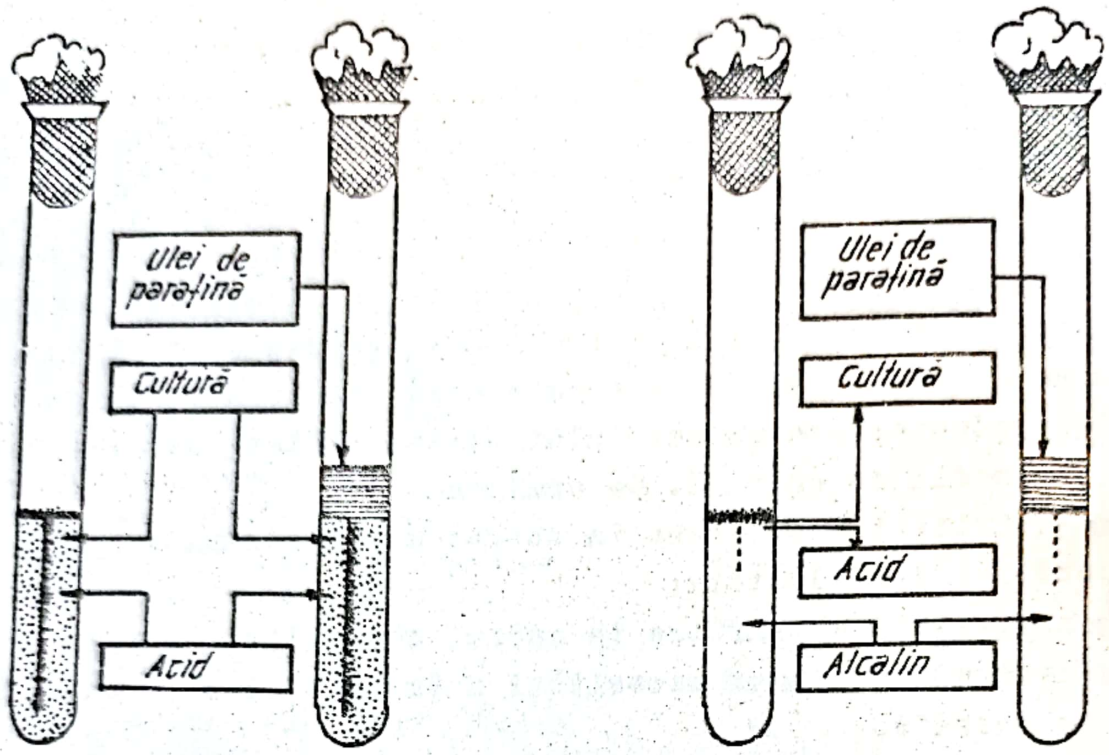


Fig.3-7 Proba de oxidare-fermentare
Bacteriile oxidative: produc o acidifiere redusă (CO_2, care rezultă din oxidările cu care este cuplată respiraţia) limitată la zona aerobă a tubului neparafinat. In tubul parafinat nici o modificare sau chiar lipsa culturii. Bacteriile oxidative sînt strict aerobe sau microaerofile.
Bacteriile fermentative: produc o acidifiere intensă (acumulare de acid lactic, acid formic etc.). Acidifierea mediului se produce în ambele tuburi.
Bacteriile fără acţiune asupra carbohidratului lasă mediul nemodificat sau îl alcalinizează.

(iii) Determinarea căii fermentative prezintă interes pentru identificarea bacteriilor din familia Enterobacteriaceae. La aceste organisme există 2 căi fermentative principale, calea acidă mixtă şi calea butilen-glicolică.

Bacteriile care folosesc calea acidă mixtă acidifică puternic mediu (pH sub 4,5) prin acumulare de cataboliţi finali acizi (glucoză ⟶ acid piruvic ⟶ alcool etilic, acid acetic, acid formic, acid lactic, acid succinic). Acidifierea este pusă în evidenţă prin reacţia la roşu metil.

Bacteriile care folosesc calea butilen-glicolică produc o acidifiere redusă şi tranzitorie a mediului, cantitatea totală de acizi formaţi fiind mult mai mică decît în primul caz (glucoză⟶ ⟶acid piruvic ⟶ acetilmetilcarbinol⟶ butilen-glicol). Acetilmetilcarbinolul este pus în evidenţă prin reacţia Voges-Proskauer Bacteria cercetată este însămînţată în apă peptonată şi glucozată (mediul Clark-Lubs). După 24-48 ore de incubare la 37°C, se adaugă 2 picături din soluţia indicator de roşu metil. Reacţie pozitivă (bacteria cercetată fermentează glucoza pe calea acidă mixtă)

= culoarea roşie. Dacă reacţia este negativă, apare culoarea galbenă.

Dacă reacţia la roşu metil este negativă, se execută în continuare, pe acelaşi tub cu cultură, reacţia Voges-Proskauer. La 1 ml cultură se adaugă o,6 ml soluţie alcoolică 5% de alfa-naftol şi o,2 ml soluţie apoasă 4o% de KOH. Se agită. Reacţie pozitivă= apariţia unei culori roşii intense între 15 minute şi o oră de la adăugarea reactivilor.

(iv) Spectrul de utilizare al hidraţilor de carbon se cercetează prin cultivarea bacteriei în apă peptonată în care s-a introdus hidratul de carbon respectiv în proporţie de 1% şi un indicator de pH pentru evidenţierea metaboliţilor acizi. Introducerea în mediu a unui tub Durham (tub mic închis la o extremitate şi introdus în mediu cu gura în jos) permite evidenţierea metaboliţilor gazoşi. Tuburile sînt incubate 7 zile la 37°C şi urmărite zilnic pentru producerea de acid şi gaz. Fermentarea unor hidraţi de carbon se poate cerceta şi pe medii solide după incorporarea lor în mediu împreună cu un indicator de pH. Dacă zahărul este fermentat produce acidifierea mediului în jurul coloniei bacteriei respective. Colonia şi porţiunea de mediu din jur capătă culoarea caracteristică indicatorului în mediu acid. Dacă bacteria se însămînţează prin înţepare în profunzimea unui astfel de mediu, producerea de gaz se evidenţiază prin fragmentarea coloanei de mediu prin bule de gaz.

(2) Activităţi enzimatice în cadrul catabolismului protidic

(i) Activitatea proteolitică se cercetează prin însămînţarea bacteriei în mediu gelatinat (mediul însămînţat prin înţepare este incubat la 22°C şi se urmăreşte pînă la 3o zile pentru apariţia esculturii şi a lizei), pe ser coagulat (urmărire pînă la 14 zile de incubare la 37°C).

(ii) Producerea de hidrogen sulfurat. Bacteria de cercetat se însămînţează prin înţepare în geloză nutritivă cu acetat de plumb sau în tubul în care cultivă bacteria cercetată se fixează pe dop o bandă de hîrtie de filtru impregnată cu acetat de plumb. Se urmăreşte apariţia sulfurii de plumb de culoare neagră: înnegrirea traiectului de însămînţare a bacteriei sau înnegrirea hîrtiei de filtru indicator.

(iii) Producerea de urează se urmăreşte prin însămînţarea bacteriei cercetate într-un mediu care conţine uree şi un indicator de pH. Virarea indicatorului în domeniul alcalin ca urmare a cultivării bacteriei atestă formarea de amoniac prin hidroliza ureei.

(iv) Producerea de indol prin dezaminarea triptofanului. Bacteria de cercetat este cultivată timp de 24-48 ore în apă peptonată. Apariţia indolului se evidenţiază cu ajutorul reactivului Ehrlich (p.dimetilaminobenzaldehidă 4 g, alcool etilic 96% 38o ml, acid clorhidric concentrat 8o ml). La tubul de cultură se adaugă 1 ml reactiv Ehrlich. Apariţia unui inel roşu-rubiniu la suprafaţa mediului indică prezenţa indolului.

(v) Producerea de aminoacid-decarboxilaze se evidenţiază prin apariţia unei reacţii alcaline în urma cultivării bacteriei cercetate în medii conţinînd aminoacizii respectivi (arginină, lizină, ornitină).

(vi) Producerea aminoacid-dezaminazelor. Cultivarea bacteriei cercetate pe medii conţinînd aminoacizii respectivi (fenilalanină etc.) determină apariţia acizilor alfa-cetonici corespunzători.

Aceştia dau cu clorura ferică o culoare verde.

(vii) Producerea arginin-hidrolazei. Bacteria cercetată se cultivă în mediu conţinînd arginină. Ca urmare a hidrolizei argininei apare amoniac. O reacţie pozitivă se traduce deci prin apariţia de amoniac care dă cu reactivul Nessler o culoare brună.

(3) Determinarea unor necesităţi nutritive

Se face pe medii sintetice la care se adaugă substanţele respective: diferiţi factori de creştere, substanţe oferite ca sursă de carbon, azot etc.

Scanned with OKEN Scanner

4. METODE DE CULTIVARE A VIRUSURILOR, RICKETTSIILOR SI CHLAMYDIILOR

VALERIA V. MOROSANU

Microorganisme cu o biologie particulară, virusurile sînt replicate, de celulele pe care le parazitează, la comanda informaţiei genetice înscrise în acidul nucleic viral (DNA sau RNA).

Sistemele celulare vii folosite pentru cultivarea virusurilor sînt: culturi de celule „i n v i t r o", embrioni de găină şi animale de laborator sensibile.

Rickettsiile şi chlamydiile, bacterii parazite obligat intracelular, nu pot fi cultivate pe medii de cultură artificiale. De aceea pentru cultivarea acestor bacterii folosim aceleaşi metode ca şi pentru cultivarea virusurilor: sisteme celulare vii.

4.1. Culturi de celule „i n v i t r o"

Celulele obţinute din ţesuturile unui organism, prin biopsie sau imediat după moartea acestuia, pot fi menţinute în viaţă şi se pot multiplica, dacă au la dispoziţie condiţii adecvate de nutriţie, temperatură şi pH. Culturile de celule pot fi realizate din ţesuturi umane, animale, adulte sau embrionare, normale sau neoplazice. Deosebim:

(i) Culturi de celule primare, care sînt preparate extemporaneu din fragmente de ţesut recoltate direct de la om sau animal. Pot fi de tip epitelial sau fibroblastic, în funcţie de tipul de celulă predominant.

(ii) Tulpini de celule diploide rezultate din subcultivarea celulelor fibroblastice care îşi menţin cariotipul diploid normal. Aceste celule supravieţuiesc „i n v i t r o" timp de 4o-5o generaţii.

(iii) Liniile de celule care sînt culturi de celule, frecvent neoplazice, cu potenţial de multiplicare practic nelimitat „i n v i t r o".

Laboratorul de culturi celulare trebuie să dispună de: sticlărie neutră, pregătită în mod obligator după un anumit protocol, medii nutritive care să ofere celulelor toate condiţiile pentru

creştere şi multiplicare activă „i n v i t r o" (medii de creştere) şi respectiv supravieţuire (medii de întreţinere), condiţiile stricte ale metodologiei lucrului aseptic şi un personal specializat.

Principiul tehnicii de preparare a culturilor de celule primare. Fragmentul de ţesut sau organ, după spălare şi secţionare, este supus acţiunii unui agent de dispersie enzimatică (tripsină o,25%, versen o,o2%) şi mecanică (agitator electromagnetic). Se obţine astfel o suspensie de celule care se verifică din punct de vedere al viabilităţii şi se ajustează la concentraţia de 15o.ooo-2oo.ooo celule/ml mediu de creştere. Suspensia de celule, astfel obţinută, este introdusă în cantităţi care variază cu recipientul (de exemplu, 2 ml suspensie de celule pentru un tub 16/16o mm). Recipientele (eprubete sau plăci) sînt acoperite cu dopuri de cauciuc atoxic sau ebonită şi incubate, în poziţie orizontală sau înclinată la 5°, la 37°C; după un anumit interval se schimbă mediul de creştere. Celulele se ataşează pe sticlă formînd iniţial insule, apoi, prin multiplicare activă, un strat monocelular (film celular). In acest moment, mediul de creştere este înlocuit cu un mediu de întreţinere. Urmărirea dezvoltării filmului celular se efectuează cu ajutorul microscopului inversat sau a lupei binoculare.

Principiul tehnicii de preparare a culturilor de celule diploide şi culturilor de linie este acelaşi, cu diferenţa că suspensia de celule este obţinută prin detaşarea celulelor subcultivate în recipiente corespunzătoare (de exemplu, plăci Roux).

Culturi de celule folosite preferenţial în practica medicală

- MK: culturi primare de rinichi de maimuţă Rhesus;
- WI-38 (Wistar-38): tulpină de celule diploide umane, derivată din fibroblaşti de embrion uman (pulmon);
- HeLa: linie de celule derivată dintr-un carcinom de col uterin.

Folosirea plăcilor din material plastic cu godeuri pentru obţinerea culturilor de celule în suspensie, în raport cu metoda clasică a culturilor de celule în tub, prezintă avantajul de a necesita mai puţini reactivi, spaţiu, timp şi mînă de lucru. Metoda permite izolarea de virusuri din produsele patologice în procent de 80.

4.1.1. Aplicaţii practice ale culturilor de celule în virologie

- izolarea unor virusuri din produsele patologice recoltate de la bolnavi, în special a virusurilor care determină modificări ale filmului celular (efect citopatic): rhinovirusuri, adenovirusuri, virusul rujeolic ş.a.;
- identificarea antigenică a virusului izolat;
- prepararea de antigene virale pentru serodiagnostic;
- prepararea de vaccinuri virale.

4.1.2. Inocularea culturilor de celule în vederea izolării unui virus din produsul patologic. Filmul celular, spălat de mediul de creştere, este acoperit cu un volum de produs patologic (inoculum) prelucrat corespunzător (→ 7.6.); cultura de celule astfel inoculată este menţinută în poziţie orizontală 60 minute la 37°C (termostat) pentru adsorbţia virusului pe receptorii celulari, apoi inoculum este îndepărtat şi înlocuit cu un mediu de întreţinere. Incubarea continuă la o temperatură şi durată care variază în funcţie de virusul urmărit.

4.1.3. Multiplicarea virală poate fi urmărită prin:

(i) Examenul microscopic direct al culturii de celule care poate prezenta un proces de degenerare cauzat de replicarea virală, proces denumit efect citopatic (ECP). Astfel, unele virusuri determină rotunjirea şi desprinderea de pe sticlă a celulelor (enterovirusuri), altele, determină apariţia de sinciţii (virusul herpetic, virusul rujeolic, virusul respirator sincitial).

(ii) Reacţia de hemaglutinare. Unele virusuri (virusurile gripale, virusul paragripal, arbovirusurile ş.a.) au capacitatea de a aglutina hematii de diverse specii de mamifere sau păsări în anumite condiţii de pH şi temperatură.

Reacţia se efectuează pe plăci din material plastic cu godeuri şi poate da relaţii cantitative. Peste diluţii duble ale suspensiei virale se adaugă, în acelaşi volum, suspensia de hematii indicată. Citirea rezultatelor se face, comparativ cu martorul hematii (suspensie de hematii în diluent), după 60-90 minute de păstrare a reacţiei în condiţii de temperatură corespunzătoare virusului urmărit:

- reacţie pozitivă: hematiile aglutinate se depun formînd un strat uniform pe fundul godeului;
- reacţie negativă: hematiile se depun în „buton", identic

cu martorul hematii.

Titrul hemaglutinant este reprezentat de diluţia cea mai mare de suspensie virală care determină aglutinarea a 50% din hematii (fig.5-11).

(iii) Testul de hemadsorbţie. Dacă cultura de celule inoculată cu produs patologic conţine un virus hemaglutinant care s-a multiplicat, celulele infectate sînt capabile să adsoarbă hematii provenite de la diverse specii animale. Lectura testului se face la microscopul optic.

(iv) Coloraţia imunofluorescentă (→ 5.2.1.5.1.) depistează virusul matur sau antigenele virale în celulele infectate.

(v) Fenomenul de interferenţă virală. Unele virusuri (virusul rubeolic, ş.a.) nu determină efect citopatic; depistarea lor se poate realiza indirect prin incapacitatea celulelor infectate de a multiplica un virus sigur citopatogen.

4.2. Embrioni de găină

Oul de găină embrionat constituie gazda de elecţie pentru myxovirus, herpes virus, poxvirus, rickettsii şi chlamydii. Izolarea unui virus din produsul patologic sau cultivarea unui virus deja identificat se realizează prin inocularea pe diferite căi a oului de găină embrionat. Virusul este multiplicat de celulele embrionului şi a învelişurilor embrionare.

Utilarea acestui sector din laborator constă în: boxe sterile, truse pentru inocularea embrionilor (trepane, foarfece, pense, seringi), termostat cu umiditate 50-60%, reglat la 39°C pentru incubarea embrionilor de găină înainte de inoculare şi la 35°C pentru incubarea embrionilor inoculaţi; embrioni de găină rasa Leghorn (ouă de găină fecundate); personal calificat.

4.2.1. Aplicaţii practice ale ouălor de găină embrionate în microbiologie

- izolarea şi identificarea unor virusuri din produse patologice;
- prepararea de antigene virale, rickettsiene şi chlamydiale pentru serodiagnostic;
- prepararea de vaccinuri virale şi rickettsiene.

4.2.2. Tehnici de inoculare a embrionilor de găină (fig.4-1); tehnici de recoltare a învelişurilor şi lichidelor embrionare

(fig.4-2). 4.2.2.

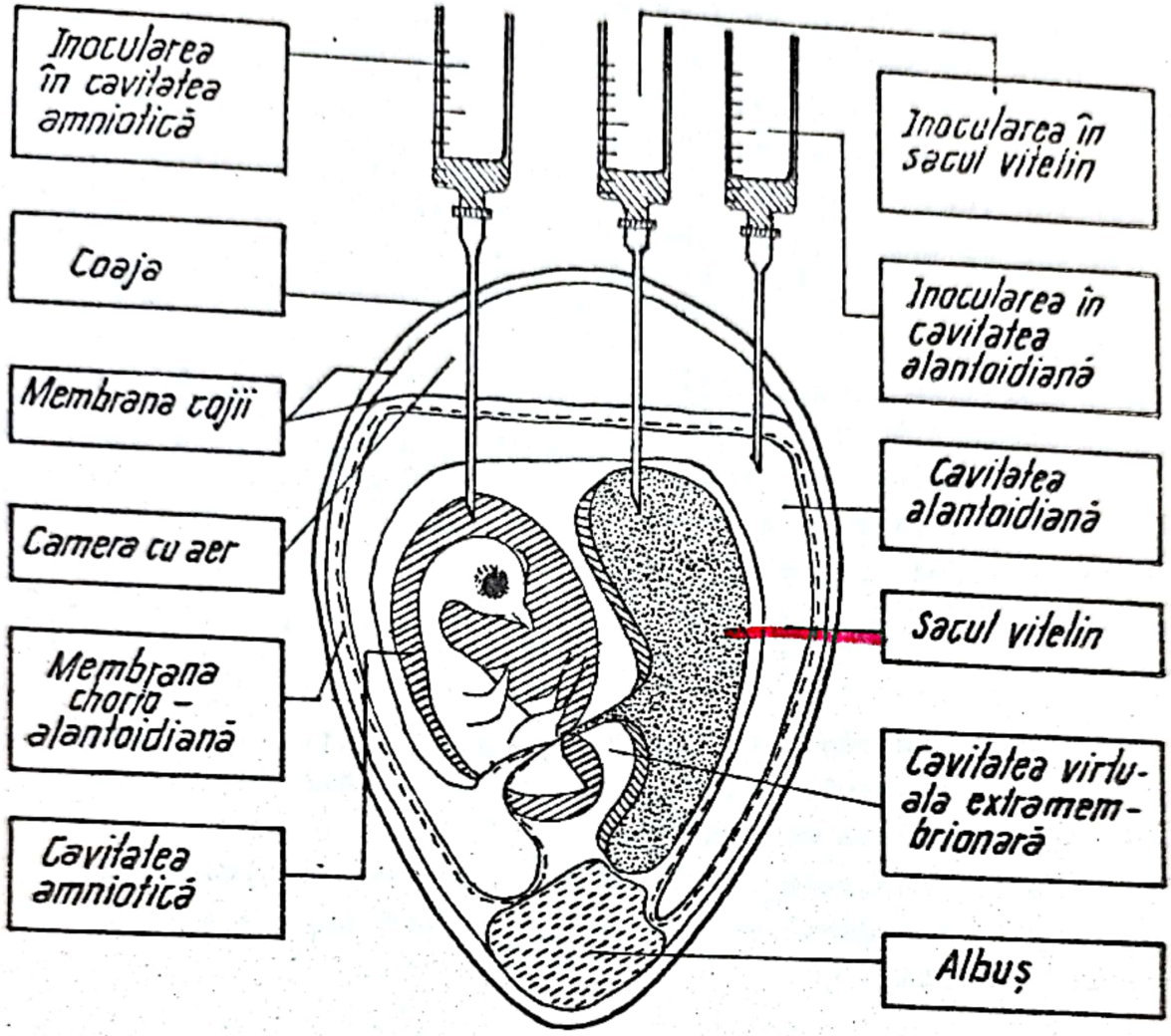


Fig.4-1 Embrionul de găină: învelişuri şi cavităţi embrionare; diferite căi de inoculare (schematic)

Cu ajutorul ovoscopului, în boxă întunecată, este verificată viabilitatea fiecărui embrion. Embrionii vii se inoculează; se incubează la 35°C un interval de 2-5 zile după care se recoltează lichidele sau învelişurile embrionare (în funcţie de microbul urmărit).

Pentru a evita hemoragiile în timpul recoltării, embrionii se sacrifică prin menţinere la frigider peste noapte.

Inocularea în cavitatea alantoidiană (embrioni în vîrstă de 7-11 zile) este tehnica utilizată pentru cultivarea virusurilor gripale, paragripale, urlian, rujeolic. Virusul este multiplicat de celulele membranei chorioalantoidiene şi eliminat în lichidul

alantoidian.

Inocularea în cavitatea amniotică (embrion în vîrstă de 7 zile) este tehnica utilizată pentru cultivarea virusurilor gripale, paragripale, urlian şi rujeolic. Virusul este replicat în celulele sacului amniotic şi epiteliului respirator embrionar şi eliminat în lichidul amniotic.

Inocularea în sacul vitelin (embrioni în vîrstă de 5-7 zile) este tehnica utilizată pentru cultivarea rickettsiilor şi chlamydiilor. Microbul se multiplică şi rămîne cantonat în celulele sacului vitelin.

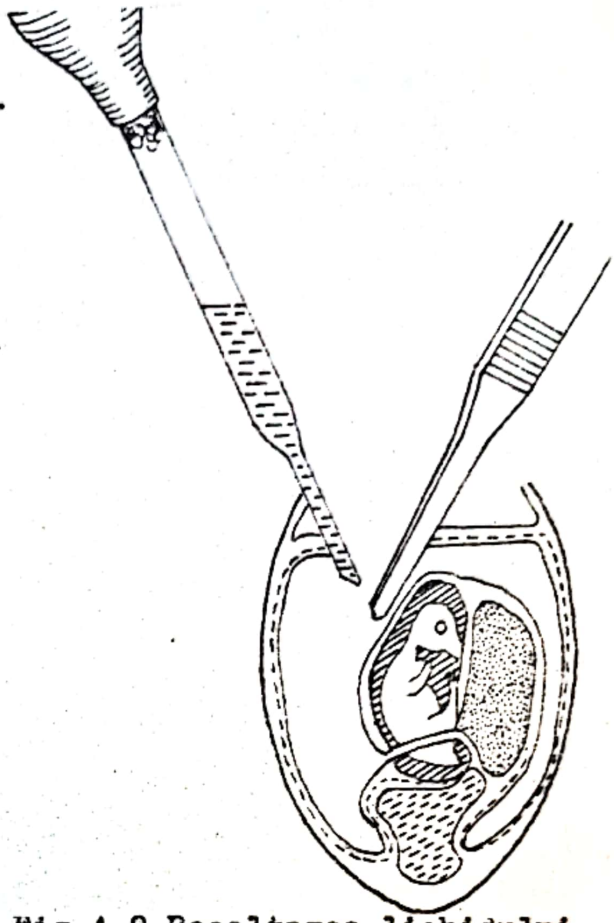


Fig.4-2 Recoltarea lichidului alantoidian

Recoltarea membranei coriolantoidiene şi a sacului vitelin se face după evacuarea conţinutului embrionului; membrana coriolantoidiană se decolează de pe membrana cojii, iar sacul vitelin se detaşează după secţionarea cordonului ombilical.

4.3. Animale de laborator

Cronologic, animalele de laborator au constituit primele gazde pentru izolarea şi identificarea agenţilor virali.

Erorile de diagnostic datorate prezenţei infecţiilor latente cu diferite virusuri, intervenţiei amprentelor imunologice, reactivitatea neuniformă dictată de particularităţile individuale ale animalului, au constituit motivele care au determinat limitarea folosirii acestora în laboratorul de virologie. Intreţinerea unei biobaze şi a animalelor „germ-free" adaugă noi dificultăţi.

Animalele de laborator de uz curent: şoarecele alb, cobaiul, hamsterul auriu, iepurele şi, în situaţii particulare, maimuţa sînt folosite pentru

- izolarea (aproape exclusiv) a unor virusuri (virusul rabic, virusul Coxsackie, virusuri encefalitice, virusul coriomeningitei limfocitare) şi rickettsiilor sau chlamydiilor.;

- identificarea virusului, a rickettsiilor sau chlamydiilor izolate;

- prepararea de seruri imune de referinţă;

- prepararea de antigene virale pentru serodiagnostic (arbovirusuri ş.a.)

Multiplicarea virală este evidenţiată prin:

(i) infecţia experimentală caracteristică, cu semne clinice care variază în funcţie de microbul izolat;

(ii) demonstrarea prezenţei microbului în umori sau organele ţintă;

(iii) examene histopatologice pentru depistarea modificărilor celulare degenerative, inflamatorii şi apariţia de incluzii virale uneori caracteristice.

Scanned with OKEN Scanner

5. REACTIILE ANTIGEN-ANTICORP IN LABORATORUL DE MICROBIOLOGIE

VALERIA V. MOROSANU

5.1. Aspecte generale şi definiţii

A n t i g e n este orice substanţă care pătrunsă în organismul vertebratelor provoacă un răspuns imun: induce elaborare de anticorpi (imunogenitate) şi reacţionează specific i n v i v o şi i n v i t r o cu anticorpii complementari (specificitate).

In structura chimică a antigenului se disting două componente:

- un suport coloidal, proteină cu moleculă mare şi rol de „purtător" al grupării determinante;
- gruparea determinantă (determinant antigenic sau epitop): segment din molecula de antigen responsabil pentru specificitate. Un antigen poate avea unul sau mai mulţi epitopi, care pot să fie sau nu identici.

A n t i c o r p i i sînt imunoglobuline serice sintetizate de plasmocite ca răspuns la stimularea indusă de antigen, capabile să se combine specific cu acesta.

Imunoglobulinele anticorp (anticorpi umorali) aparţin claselor: IgM, IgG, IgA, IgE şi IgD şi apar în sînge şi alte umori.

Combinarea specifică antigen-anticorp are loc între situsul de combinare (paratop) şi determinantul antigenic (epitop). Situsul de combinare este localizat pe fragmentul Fab al imunoglobulinelor (fig.5-1).

Limfocitele T specific sensibilizate (anticorpi celulari) prezintă pe suprafaţa lor sedii de recunoaştere şi cuplare a antigenului (receptor pentru antigen). Receptorul pentru antigen este o structură chimică specifică integrată în membrana limfocitelor, capabilă să lege antigenul cu aceeaşi specificitate ca şi anticorpul. Receptorul pentru antigen de pe limfocitele T are o structură chimică încă necunoscută, dar se acceptă că porţiunea care susţine situsul de recunoaştere a antigenelor este de natură imunoglobulinică.

In laboratorul clinic de microbiologie sînt utilizate preponderent în diagnostic reacţiile antigen-imunoglobuline anticorp.

Scanned with OKEN Scanner

Reacţiile antigen-anticorp rezultă ca urmare a punerii în contact a grupărilor determinante ale antigenului cu situsul de combinare al anticorpului (complementaritate structurală).

Interacţiunea dintre antigen şi anticorp se bazează pe forţe de atracţie intermoleculară (atracţie electrostatică, legăturile de hidrogen, forţe Van der Waals) şi are ca efecte

- formarea unui complex molecular ale cărui dimensiuni sînt variabile, funcţie de raporturile cantitative dintre cei 2 reactivi;
- neutralizarea reciprocă a grupărilor polare ale celor 2 reactivi.

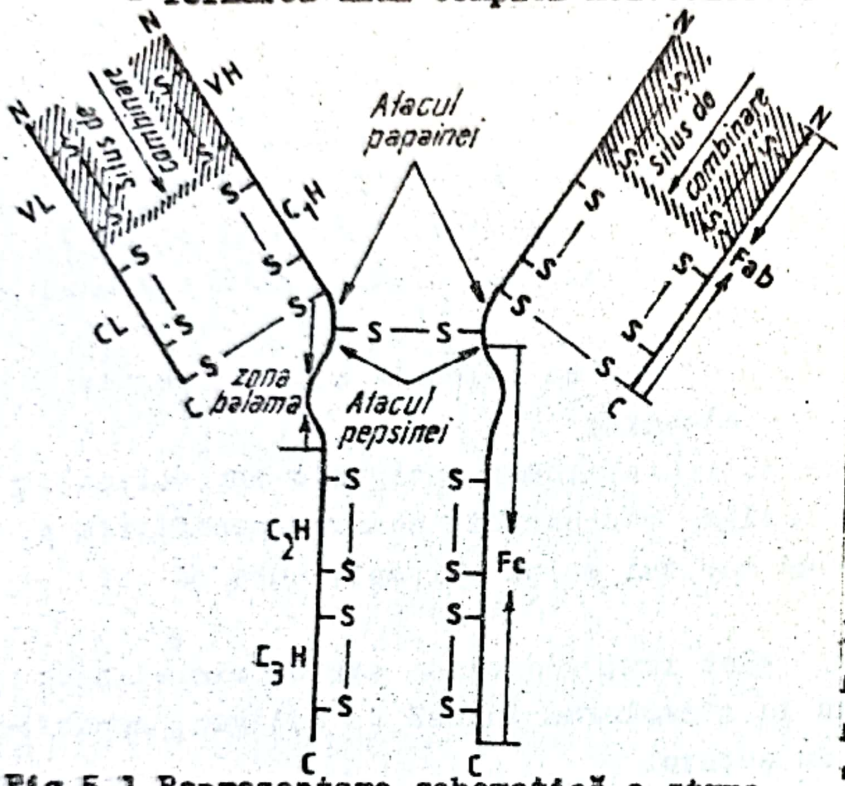


Fig.5-1 Reprezentare schematică a structurii tetrapolipeptidice a moleculei de imunglobulină

Ambele efecte reduc stabilitatea antigenului şi anticorpului ca faze disperse.

Deoarece imunoglobulinele anticorp sînt minimum bivalente (fig. 5-1) fiecare moleculă anticorp se poate uni cu sediul complementar a 2 molecule antigen; saturarea celor 2 sedii ale anticorpului nu este realizată decît dacă există o concentraţie optimă antigen-anticorp. Această bivalenţă a anticorpului şi prezenţa a cel puţin 3 determinanţi antigenici pe aceeaşi moleculă de antigen face posibilă formarea unei reţele care se poate exterioriza prin precipitarea (vizualizarea) imunocomplexului cînd acesta atinge o dimensiune suficientă (fig.5-2).

Excepţie de la acest comportament general în reacţia antigen-anticorp fac: anticorpii blocanţi şi haptenele simple.

Anticorpii care apar în cursul stadiului subacut sau cronic al brucelozei intră în reacţie cu antigenul ca elemente monovalente.

Haptenele sînt molecule lipsite de capacitate imunogenă, dar purtătoare a unei specificităţi (grupări determinante) graţie că-

reia pot reacţiona cu anticorpii complementari. Haptenele simple poartă un singur determinant antigenic, sînt monovalente.

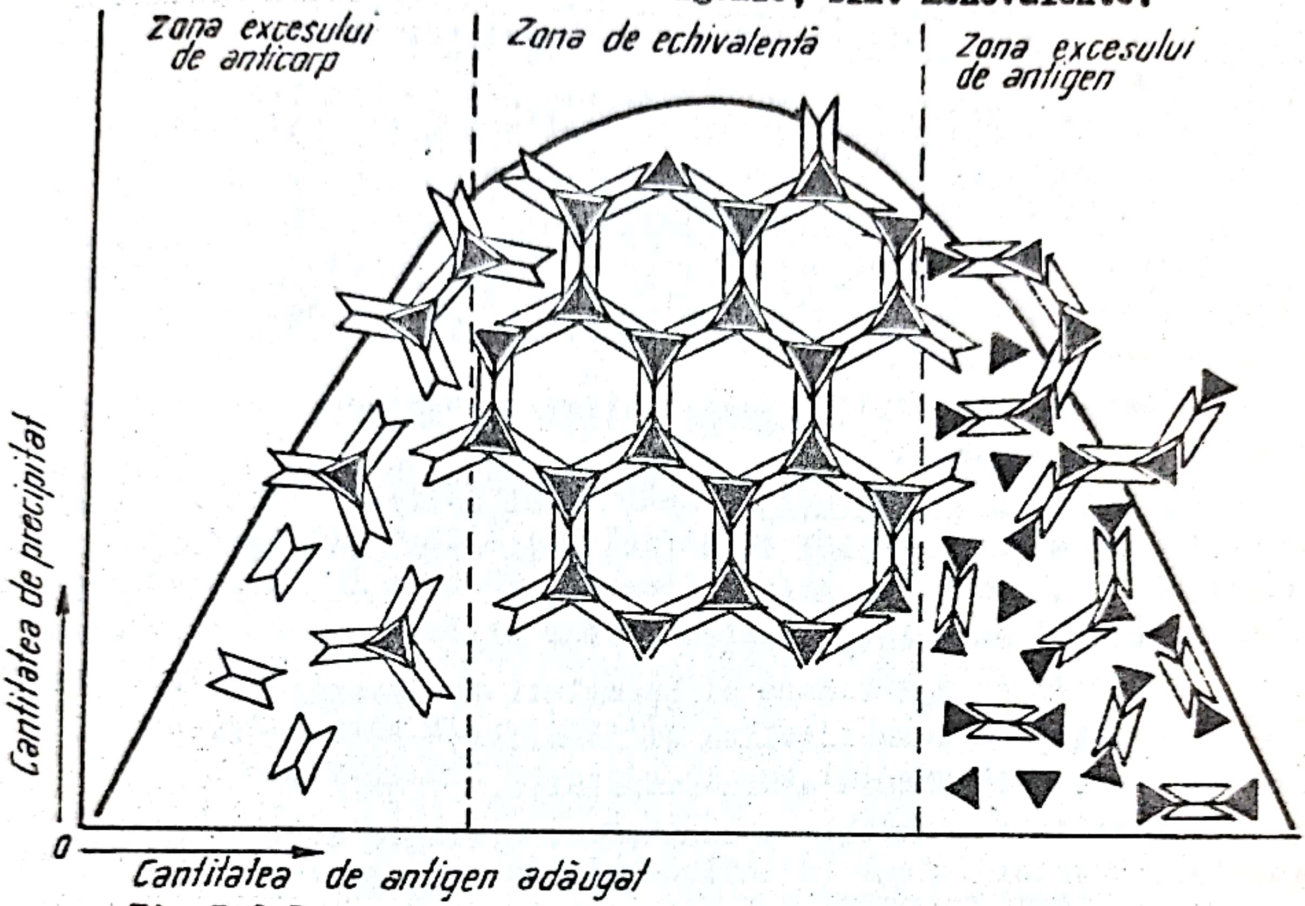


Fig.5-2 Reprezentare schematică a raporturilor cantitative în reacţia antigen-anticorp şi a consecinţelor lor asupra stabilităţii fazei disperse a reactivilor

Fenomenul de zonă. Manifestarea unei reacţii antigen-anticorp, atît i n v i v o cît şi i n v i t r o, nu este aparentă decît daca se realizează o anumită proporţie antigen-anticorp (zona de echivalenţă a reacţiei). In condiţiile excesului de antigen sau anticorp reacţia este inhibată ; numim această inhibiţie fenomen de zonă

Concentraţia salină şi pH-ul. In reacţiile antigen-anticorp este necesară o cantitate minimală de electroliţi cu scopul de a asigura o mai bună stabilitate a proteinelor anticorp; concentraţia salină optimală este concentraţia fiziologică din serul sanguin; pH-ul optimal 7,3-7,5.

Temperatura. Viteza unei reacţii antigen-anticorp creşte cu temperatura, cu un optim la 37°C. Această activare a reacţiilor imunologice în funcţie de temperatură este legată de agitarea termică a moleculelor, mişcare care măreşte şansa întîlnirii dintre

5.1.

epitopi şi paratopi, complementari structural. Deoarece agitarea termică (la 37°C) nu asigură şi soliditatea legăturilor antigen-anticorp, în unele situaţii imunocomplexul format trebuie menţinut la 4°C.

Reacţiile antigen-anticorp se desfăşoară în stadii care corespund interacţiunilor primare şi secundare.

Interacţiunile primare antigen-anticorp sau primul stadiu al reacţiei sînt rapide şi duc la formarea unui complex antigen-anticorp, solubil, evidenţiabil prin metode de înaltă sensibilitate:

- radioimuntestarea,
- metoda anticorpilor marcaţi (imunofluorescent, imunoferitină, imunoperoxidază).

Interacţiunile secundare apar în al doilea stadiu şi determină apariţia unui complex imun insolubil care poate fi evidenţiat prin:

- reacţii de precipitare,
- reacţii de aglutinare şi hemaglutinare pasivă,
- reacţii de imunocitoliză şi hemoliză,
- reacţia de fixare a complementului,
- reacţii de inhibare a unui efect biologic definit al antigenului.

Reacţia dintre antigen şi anticorpii umorali specifici acestuia poate fi detectată şi măsurată prin teste care diferă în funcţie de cantitatea şi calitatea antigenului şi anticorpului, de prezenţa sau absenţa unor cofactori (complementul) sau de factori dependenţi de gazdă dacă reacţia are loc i n v i v o.

5.2. Aplicaţiile practice ale reacţiilor antigen-anticorp se bazează pe specificitatea cuplării acestor două elemente. Sînt folosite în două scopuri:

- identificarea unui antigen necunoscut prin anticorpul complementar, prezent în seruri imune de referinţă (identificarea antigenică a unui microb);
- identificarea unui anticorp necunoscut prin antigenul corespondent (serodiagnosticul bolilor infecţioase).

Pentru a realiza aceste aplicaţii practice este indispensabilă o verificare prin martori adecvaţi a specificităţii rezultatelor obţinute (precipitare, aglutinare ş.a.)

Reacţia antigen-anticorp dă:

● relaţii calitative: simpla identificare a unui reactiv;

● relaţii cantitative: cînd punem în condiţii de reacţie diluţii succesive ale unuia din reactivi cu cantităţi constante şi cunoscute ale celuilalt reactiv. Diluţia maximă la care reacţia mai este vizibilă se numeşte titru; ea caracterizează cantitatea reactivului cercetat şi se exprimă printr-o fracţie ordinară cu numărătorul 1 sau numai prin numitorul acestei fracţii. De exemplu, titrul anticorpilor într-un ser este diluţia maximă a serului care mai dă o reacţie vizibilă cu o cantitate cunoscută şi constantă a antigenului homolog (complementar).

5.2.1. Tipuri de reacţii antigen-anticorp

5.2.1.1. Reacţia de precipitare

Principiu: reacţia are loc între un antigen solubil (în stare coloidală) şi anticorpul complementar (anticorp precipitant); rezultatul este apariţia unor complexe insolubile (precipitate sau floculate).

Reacţia poate fi executată:

- în mediu lichid (reacţia de precipitare inelară, reacţia de floculare),
- în mediu gelificat (imunodifuzia, imunoelectroforeza)

5.2.1.1.1. Reacţia de precipitare inelară

Tehnica:

- Într-un tub capilar se aspiră o coloană de cca 1-1,5 cm ser imun precipitant; se şterge îngrijit exteriorul tubului cu hîrtie de filtru pentru îndepărtarea urmelor de ser.
- Se aspiră o cantitate egală de extract antigenic.
- Se aplică indexul pe orificiul superior al capilarului şi se obturează orifi-

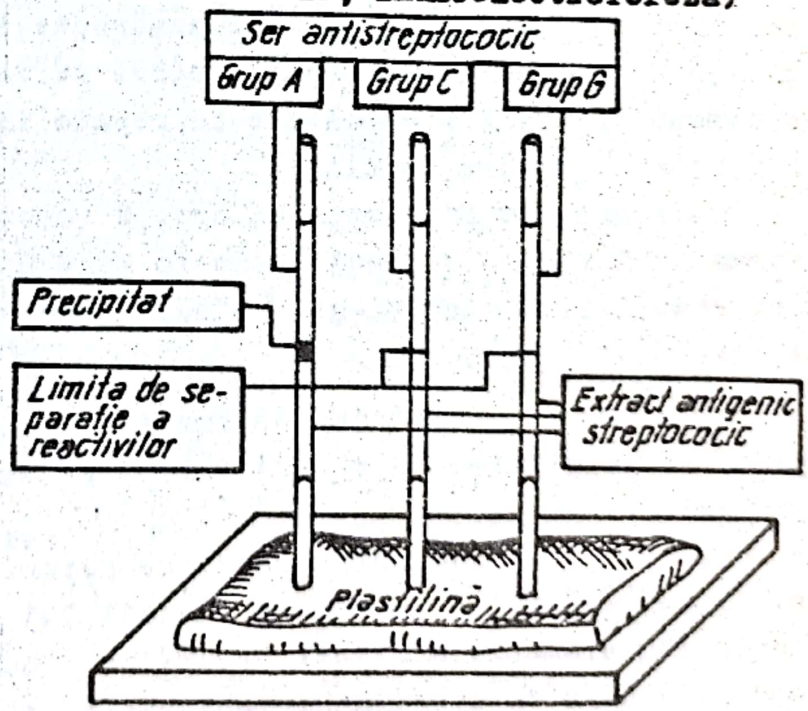


Fig.5-3 Reacţia de precipitare inelară efectuată în tuburi capilare

siul inferior implantînd vertical tubul într-un stativ cu plastilină astfel încît deasupra şi dedesubtul coloanei de reactivi să rămînă un spaţiu cu aer.

Lectura: se face după 5 minute pe fond negru. In tubul în care există corespondenţă imunologică între anticorpul precipitant şi antigen, la limita de separare a celor doi reactivi apare un precipitat albicios inelar.

5.2.1.1.2. Reacţii de precipitare în gel. Metodele mai frecvent utilizate sînt imunodifuzia şi imunoelectroforeza.

5.2.1.1.2.1. Imunodifuzia se bazează pe proprietatea moleculelor de antigen şi anticorp de a difuza în gel.

Varianta cea mai folosită este dubla difuzie radială.

Principiu: antigenul şi anticorpul difuzează radial într-un strat de gel cu apariţia unei linii de precipitare vizibilă în zona de echivalenţă.

Tehnica: pe o placă de sticlă se toarnă un strat de agar 1% în care, după gelificare, sînt săpate godeuri dispuse sub formă de rozetă (fig.5-4). Dacă în probele de investigat se urmăreşte prezenţa antigenului, aceste probe se vor repartiza în godeurile periferice ale rozetei iar în godeul central se va introduce serul imun de referinţă. Dacă se urmăreşte identificarea unui anticorp necunoscut, în godeul central se va repartiza antigenul cunoscut. Plăcile sînt lăsate în repaus într-o cutie Petri pe o hîrtie de filtru umezită.

Lectura: se face după 24 ore. O reacţie pozitivă apare sub forma unei linii de precipitare în zona dintre godeuri unde cei doi reactivi, antigenul şi anticorpul, au realizat proporţii echivalente (fig.5-4).

O altă variantă a imunodifuziei este testul Elek utilizat pentru demonstrarea i n v i t r o a toxigenezei bacilului difteric.

Tehnica: într-o cutie Petri se repartizează un mediu favorabil cultivării şi toxigenezei bacilului difteric. De-a lungul unuia din diametrele plăcii se aplică o bandă de hîrtie de filtru de 1 cm/8 cm sterilă şi îmbibată cu ser antidifteric conţinînd minimum 500 U antitoxice/ml. După ce se usucă suprafaţa mediului, perpendicular pe direcţia benzii de hîrtie se însămînţează cîte o stric din cultura fiecărei tulpini de cercetat, un

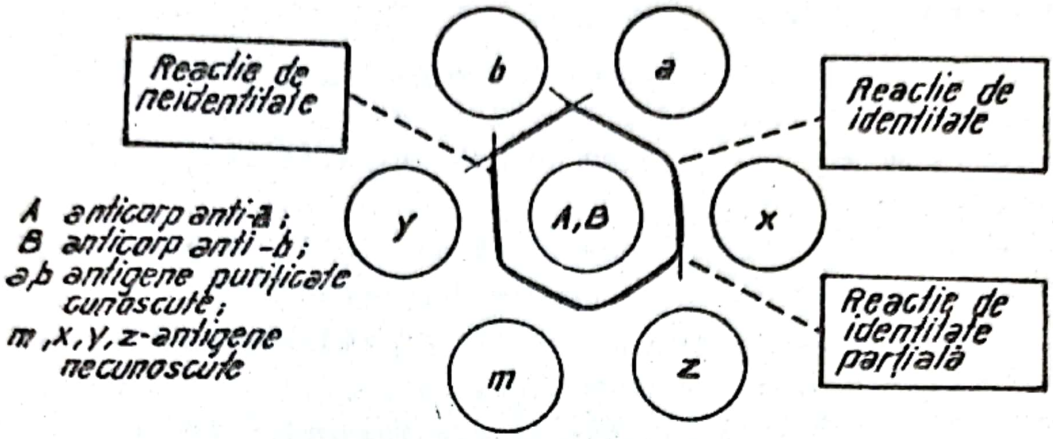


Fig.5-4 Reacţia de imunodifuzie dublă radială. In godeul central este plasat serul imun de referinţă care conţine anticorpii anti-A şi anti-B, iar în godeurile periferice antigenele necunoscute m, x, y, z şi antigenele purificate a şi b. După cum se observă, toate antigenele au reacţionat cu serul de referinţă anti-A,B.

I = reacţie de identitate (fuziunea liniilor de precipitare cu devierea lor): antigenul x este identic cu antigenul a; antigenele m, y, z sînt identice.

II = reacţie de neidentitate (liniile de precipitare nu sînt deviate şi se încrucişează complet): antigenul y este complet diferit de antigenul b.

III = reacţie de identitate parţială (deviere şi fuziune parţială a liniilor de precipitare): antigenele m, y şi z au unii determinanţi antigenici comuni cu antigenul a.

martor pozitiv şi unul negativ. Se incubează la 37°C şi se examinează placa după 24 şi 48 ore. Lectura: antitoxina (anticorpul) şi toxina (antigenul) difuzează radial din depozitele respective şi în locul unde se întîlnesc în proporţii echivalente dau linii de precipitare (fig.5-5).

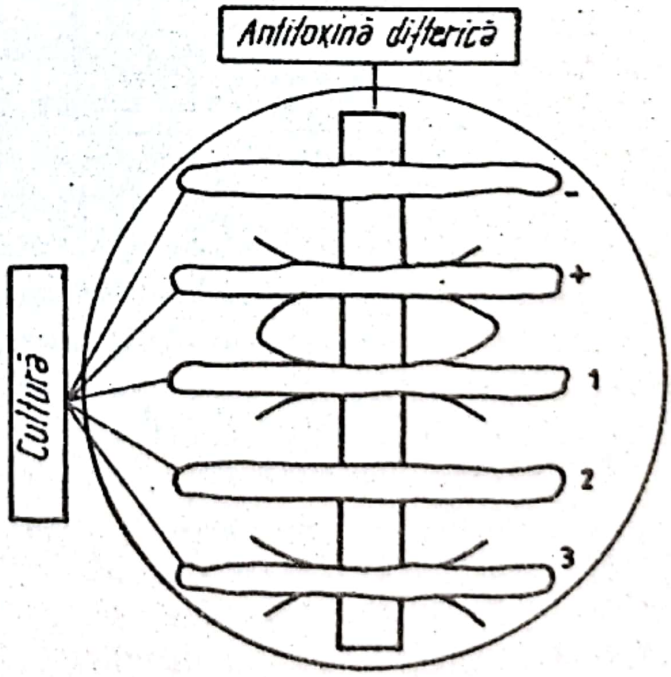


Fig.5-5 Testul Elek

5.2.1.1.2.2. <u>Imunoelectroforeza</u>

Principiu: asocierea electroforezei cu difuzia în gel de agar. Este utilizată în diferite

5.2.

variante tehnice.

Imunoelectroforeza discontinuă contracurent (numită şi contraimunoelectroforeză). In gel de agar la pH 8,2-8,6 şi cînd tamponul din gel are o forţă ionică mai mică decît cel din băile electrozilor

- anticorpii au o încărcătură electrică slab negativă şi sînt antrenaţi de curentul de electroendoosmoză spre catod;
- antigenele cu sarcină electronegativă mai mare sînt antrenate în cîmpul electric spre anod.

Dacă godeul cu anticorpi este dispus spre anod iar cel cu antigen spre catod, cei doi reactivi se deplasează rapid şi în sens contar, iar acolo unde se întîlnesc în proporţii echivalente formează o linie de precipitare (fig.5-6).

Tehnica: pe lame de sticlă se repartizează un strat de gel (agar sau agaroză 1%). In gelul de pe lamă se stanţează şiruri de perechi de godeuri. După plasarea lamelor în aparatul de electroforeză , în godeurile situate spre anod se repartizează serul imun de referinţă iar în godeurile situate spre catod se repartizează probele pentru depistarea antigenului. Este obligatorie folosirea unui maror pozitiv şi a unuia negativ. După repartizarea reactivilor, se închide circuitul electric.

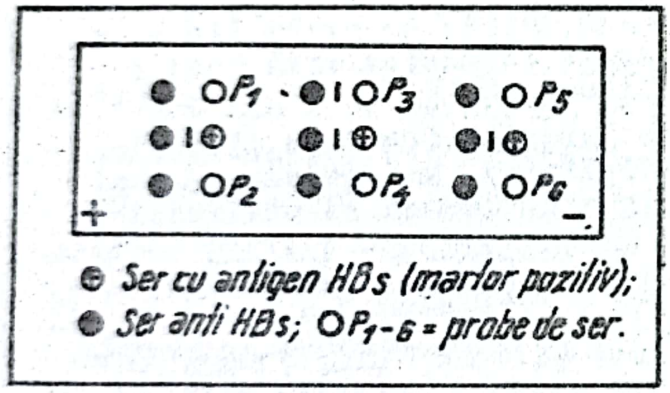


Fig.5-6 Imunoelectroforeza contracurent practicată pentru depistarea antigenului HBs în serul donatorilor de sînge. Se observă că serul donatorului 3 conţine antigen HBs

Lectura: se face în funcţie de apariţia liniei de precipitare la martorul pozitiv, uzual în 6o minute.

5.2.1.2. Reacţia de aglutinare

Principiu: cuplarea antigenelor integrate în structura unei celule (bacterii, de exemplu) cu anticorpul complementar este urmată de instabilizarea suspensiei cu formarea unor aglutinate. In funcţie de caracterele microbului care intră în reacţia de aglutinare aceasta se va citi cu oglinda concavă (bacterii), microscopie pe preparate colorate (rickettsii) sau pe fond negru (leptospire).

Reacţia de aglutinare este utilizată în două variante:

5.2.1.2.1. Reacţia de aglutinare pe lamă

Tehnica: pe o lamă de microscop bine degresată se aşează la o extremitate o picătură de ser aglutinant polivalent sau monovalent (diluat la titru) iar la cealaltă extremitate o picătură de soluţie izotonă de NaCl. Se suspensionează în ambele picături o ansă din cultura bacteriei de identificat, obţinută pe mediu solid. Lama se înclină de mai multe ori şi după 1-2 minute se observă fenomenul de aglutinare în oglinda concavă. In picătura de soluţie izotonă de NaCl (martorul reacţiei) suspensia microbiană rămîne omogenă dacă bacteria este în formă S. Apariţia unei aglutinări la martor exclude posibilitatea de a folosi reacţia de aglutinare pentru identificarea antigenică a unei bacterii (bacterie în formă R autoaglutinabilă) (fig.5-7).

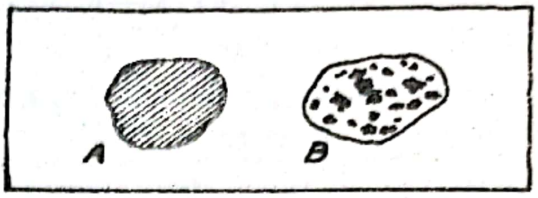


Fig.5-7 Reacţia de aglutinare pe lamă. A = reacţie negativă; B = reacţie pozitivă. In A ser anti-Salmonella grup A; în B ser anti-Salmonella grup B. Bacteria studiată este deci o Salmonella grup B

Aglutinarea pe lamă este o reacţie orientativă; rezultatele ei se verifică prin aglutinarea în tuburi.

5.2.1.2.2. Reacţia de aglutinare în tuburi

Tehnica: într-un şir de eprubete se fac diluţii duble din serul imun de referinţă (sau din serul de investigat), în volum de 0,5 ml, începînd cu diluţia 1:10.

- Se adaugă în acelaşi volum suspensia etalonată nefelometric a bacteriei de identificat (sau suspensie etalonată a unei bacterii cunoscute, atunci cînd trebuie să identificăm şi să titrăm un anticorp). Martorul reacţiei este suspensia bacteriană în soluţie salină izotonă (pentru a observa dacă nu aglutinează spontan).

- Se agită tuburile; se menţin la 37°C, 2 ore pentru reacţiile cu antigene flagelare şi 20 ore pentru reacţiile cu antigene somatice.

Lectura:

- La serul identificării antigenice a unui microb: serul care

aglutinează în diluţia cea mai mare (pînă la titrul nominal indicat de furnizor) arată identitatea microbului izolat;

- în cazul identificării anticorpului (serodiagnostic), diluţia cea mai mare de ser la care mai apare o reacţie pozitivă reprezintă titrul anticorpului din ser (fig.5-8). Comparativ cu reacţia de aglutinare pe lamă, reacţia de aglutinare în tub este mai sensibilă. De aceea este reacţia indicată pentru titrarea anticorpilor în seruri.

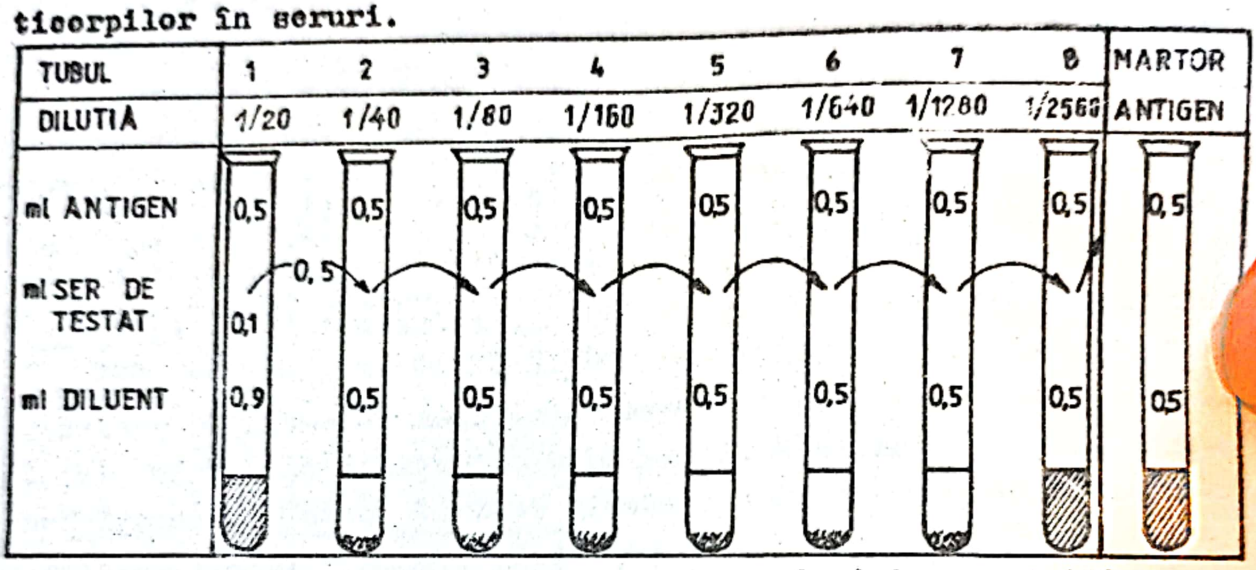


Fig.5-8 Reacţia de aglutinare pentru depistarea şi titrarea anticorpilor în serul unui pacient (schematic). Titrul aglutininelor în serul cercetat = 1:1280. La diluţia 1:20 lipseşte fenomenul de aglutinare = fenomen de prozonă

5.2.1.3. Reacţia de fixare a complementului

Principiu: reacţia se desfăşoară în doi timpi

- în primul timp se pun în contact diluţii de ser imun (ale serului de referinţă sau ale serului de investigat), decomplementat prin încălzire 30 minute la 56°C, cu antigenul, în prezenţa complementului; totul se menţine 18 ore la 4°C;

- în al doilea timp al reacţiei se adaugă un cuplu antigen-anticorp cunoscut, sistemul indicator, preparat dintr-o suspensie de hematii de berbec sensibilizate cu anticorpi anti-hematii berbec. Reacţia este menţinută 30 minute la 37°C apoi se introduce 18 ore la 4°C.

Interpretare:

- reacţie pozitivă = dacă există complementaritate între anticorpul şi antigenul introdus în reacţie, pe imunocomplexul format se va fixa complementul; hematiile sensibilizate ale sis-

temului indicator nu sînt lizate şi sedimentează sub formă de buton;

- <u>reacţie negativă</u> = antigenul nu corespunde anticorpului din reacţie, complementul rămas liber se va fixa pe cuplul indicator determinînd liza hematiilor (fig.5-9).

Reacţia de fixare a complementului se vizualizează cu ajutorul unui sistem indicator (cuplu hemolitic).

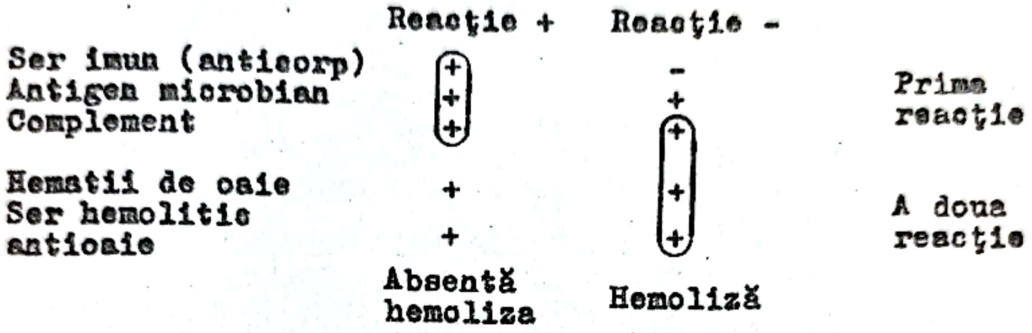


Fig.5-9 Schema reacţiei de fixare a complementului

Reacţia se execută pe plăci din material plastic cu godeuri (fig.5-1o). Reactivii sînt folosiţi în volume de o,1 ml, la diluţii optime, determinate prin titrare anterioară, volumul final al reacţiei fiind de o,4 ml.

Interpretarea corectă a reacţiei de fixare a complementului se va face după lectura martorilor:

- martor ser de investigat,
- martor ser pozitiv,
- martor ser negativ,
- martor antigen,
- martor complement,
- martor cuplu hemolitic (sistem indicator) .

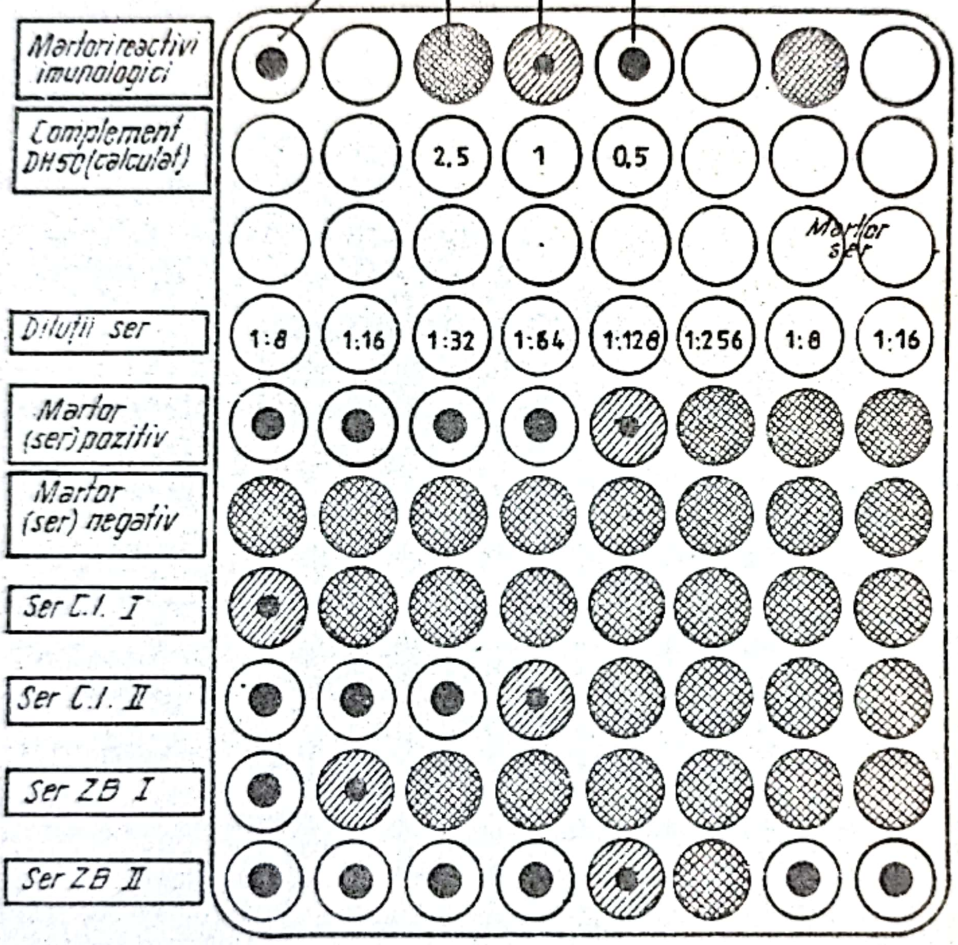
In fig.5-1o este prezentată schema de ansamblu a reacţiei de fixare a complementului pe placă din material plastic cu godeuri pentru titrarea anticorpilor într-un ser.

5.2.1.4. <u>Reacţii de neutralizare sau inhibare</u> a unor efecte biologice definite ale antigenului

O sumă de antigene, în urma reacţiei cu anticorpii complementari, pierd efecte biologice care le caracterizează. Aşa sînt: <u>neutralizarea</u> toxinelor, a enzimelor, a infectivităţii virusurilor, <u>inhibarea</u> adsorbţiei microbilor pe un substrat celular (de exemplu, inhibarea hemaglutinării prin virusuri hemaglutinante,

REACTIVI IMUNOLOGICI : MARTORI

	Martor cuplu hemolitic	Martor complement			Martor antigen	
Diluent	0,3	0,2	0,2	0,2	0,1	I-ul timp
Complement 1:1	–	0,1	–	–	0,1	
Complement 1:2,5	–	–	0,1	–	–	
Complement 1:5	–	–	–	0,1	–	
Antigen	–	–	–	–	0,1	
Cuplu hemolitic	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	II-lea timp



Reactivi	Reactia	Martor +	Martor –	Martor ser
Diluent	–	–	–	0,1
Serul testat	0,1	–	–	0,1
Ser pozitiv	–	0,1	–	–
Ser negativ	–	–	0,1	–
Antigen 2U	0,1	0,1	0,1	–
Complement 2,5 DH50	0,1	0,1	0,1	0,1
Cuplu hemolitic	0,1	0,1	0,1	0,1

Fig.5-1o Schema reacției de fixare a complementului pe placă din material plastic cu godeuri pentru titrarea anticorpilor serici

inhibare a hemadsobţiei ş.a.)

5.2.1.4.1. Dozarea antistreptolizinei O se bazează pe o asemenea reacţie de neutralizare.

Principiu: majoritatea tulpinilor de Streptococcus pyogenes produc streptolizină O (SLO), o hemolizină oxigen-labilă, antigenică. După infecţii streptococice, în serul pacienţilor apar anticorpi care neutralizează efectul hemolitic al SLO, antistreptolizine O (ASLO).

Tehnica:

- In primul timp al reacţiei, diluţii ale serului de testat sînt amestecate cu o doză standard de SLO (1 unitate combinantă) şi incubate pentru desfăşurarea reacţiei de neutralizare.

In al doilea timp al reacţiei, neutralizarea SLO este testată cu o suspensie standard de hematii (de iepure sau de oaie).

Lectura: neutralizarea SLO se traduce prin lipsa hemolizei, absenţa neutralizării prin hemoliză. Titrul ASLO este dat de ultima diluţie de ser care a neutralizat complet 1 unitate combinantă SLO. In această diluţie se află 1 unitate ASLO. Rezultă că serul brut conţine în aceeaşi unitate de volum un număr de unităţi ASLO egal cu inversul acestei diluţii.

5.2.1.4.2. Testul de seroprotecţie a şoarecilor pentru identificarea toxinei botulinice într-un aliment este un alt exemplu pentru reacţia de neutralizare.

Principiu: antitoxina botulinică inoculată la un animal îl protejează de efectele toxinei homologe inoculată după cîteva ore.

Tehnica: trei perechi de şoareci sînt protejate prin inoculare subcutanată a 0,5 ml (3oo unităţi antitoxice internaţionale)

- ser antibotulinic A, prima pereche
- ser antibotulinic B, a doua pereche
- ser antibotulinic E, a treia pereche.

După 2-3 ore, celor 3 perechi de şoareci protejate prin ser antibotulinic şi unei perechi martor li se inoculează intraperitoneal 0,5 ml filtrat din alimentul suspectat a conţine toxină botulinică. Se urmăresc animalele.

Interpretarea rezultatelor. Sînt posibile 3 eventualităţi.

(i) Supravieţuieşte o singură pereche de şoareci: alimentul conţine toxină botulinică, iar serul care a protejat această pereche de şoareci identifică şi serotipul toxinei.

(ii) Toţi şoarecii au supravieţuit: alimentul nu conţine to-

xină botulinică.

(iii) Toţi şoarecii au murit: cauza morţii nu este toxina botulinică A, B sau E.

5.2.1.4.3. Reacţia de inhibare a hemaglutinării (RIH)

Principiu: activitatea hemaglutinantă a unui microb, uzual virus (→ 4.1.3.2.), este inhibată prin anticorpul homolog.

Tehnica: în condiţii de pH şi temperatură optime pentru activitatea hemaglutinantă a unui microb dat, peste diluţiile de ser se adaugă, în acelaşi volum, o doză fixă de antigen hemaglutinant şi suspensia de hematii. Obligator, reacţia este însoţită de

- martor pentru sedimentarea hematiilor,
- martor care atestă lipsa activităţii hemaglutinante a serului testat (izo- sau heteroaglutinine).

Lectura reacţiei se face după 6o-9o minute.

Reacţie pozitivă: dacă în ser există anticorpi homologi antigenului hemaglutinant (anticorpi inhibitori ai hemaglutinării), fenomenul de hemaglutinare este inhibat, hematiile vor sedimenta în formă de buton. Titrul inhititor al hemaglutinării este dat de ultima diluţie de ser la care se obţine o inhibare 50% a hemaglutinării.

Reacţie negativă: în absenţa anticorpului homolog, hematiile sînt aglutinate (fig.5-11).

5.2.1.5. Reacţii cu anticorpi marcaţi

5.2.1.5.1. Imunofluorescenţa

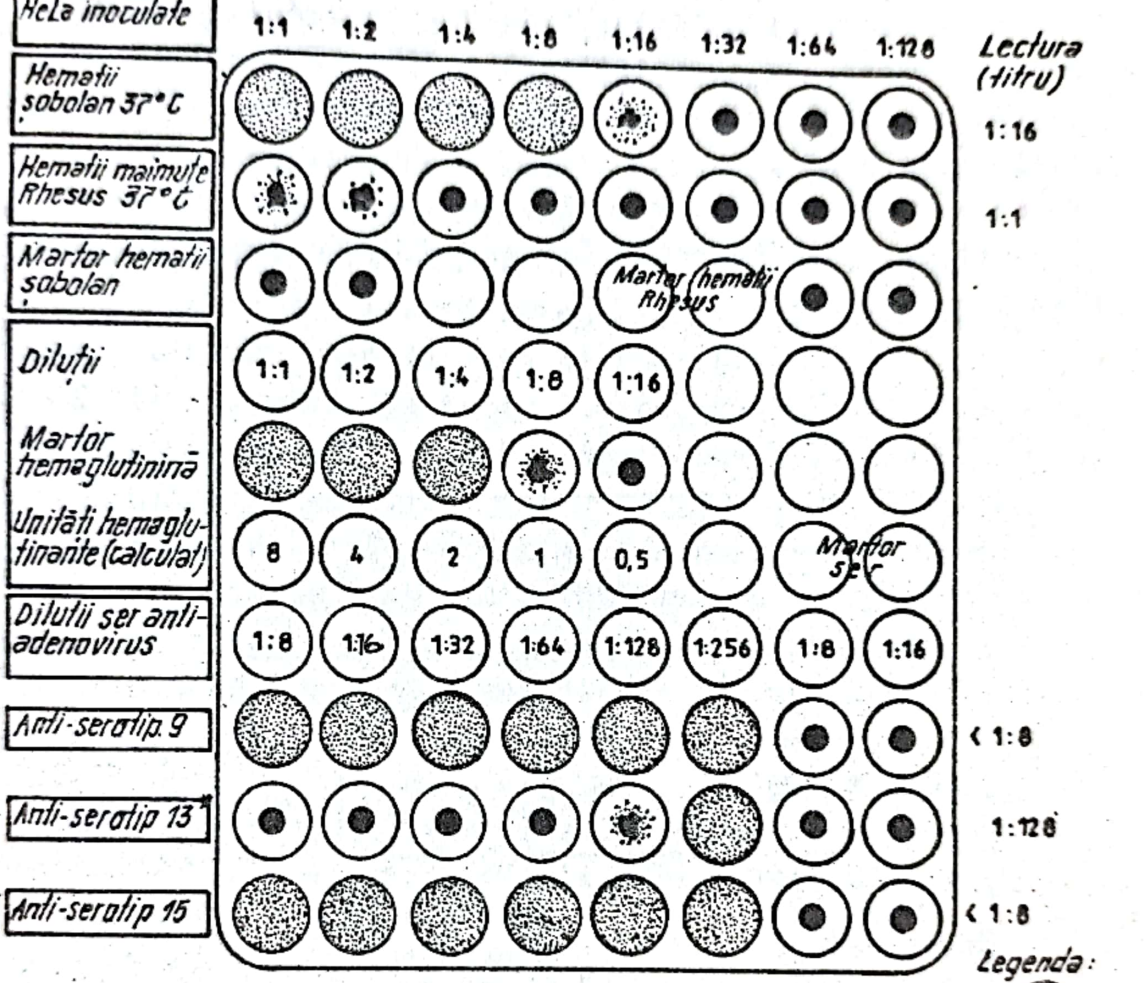
Principiu: anticorpii marcaţi cu substanţe fluorescente (izotiocianat de fluoresceină, rodamină) se cuplează cu antigenul homolog fixat pe un frotiu şi îl fac vizibil la microscopul cu radiaţii ultraviolete.

Tehnica directă constă în aplicarea anticorpului marcat pe frotiul care conţine antigenul de identificat (de exemplu, un antigen microbian) . După incubare pentru dezvoltarea reacţiei, frotiul se spală.

Lectura: dacă antigenul de pe frotiu corespunde specific anticorpului fluorescent, se formează un complex antigen-anticorp vizibil pe frotiul examinat la microscopul cu radiaţii ultraviolete.

Procedeul este dezavantajos deoarece fiecare antigen cerce-

Reactivi	Titrarea hemaglutininei	Martor hematii
Hemaglutininā necunoscută (diluții)	0,25	–
Suspensie hematii	0,25	0,25
Diluent	–	0,25



Reactivi	Verif. diluției de lucru	RIH	Martor ser
Hemaglutininā dilutia de lucru 1:1-1:16	0,25		
Hemaglutininā 8 u/0,25 ml		0,25	
Ser imun (diluții)		0,25	0,25
Suspensie hematii	0,25	0,25	0,25
Diluent			0,25

Fig.5-11 Schema reacțiilor de hemaglutinare și de inhibare a hemaglutinării practicate în scopul identificării unei tulpini de adenovirus izolată în cultură de celule HeLa. Aspectul hemaglutinării (aglutinare optimă la 37°C a hematiilor de șobolan și slabă a celor de maimuță Rhesus) sugerează serotipurile 9,13,15 RIH practicată cu serurile anti-adenovirus serotip 9,13 și 15 identifică tulpina izolată ca adenovirus serotip 13 (titrul inhibitor al hemaglutinării 1:128 comparativ cu titrurile <1:8 obținute cu serurile anti-serotip 9 și 15)

tat necesită prepararea unui imunoconjugat specific.

Tehnica indirectă se efectuează în doi timpi:

(i) un frotiu care conţine un antigen cunoscut se acoperă cu serul de cercetat; se incubează; se spală;

(ii) frotiul se acoperă cu o soluţie de anticorpi anti-gama-globulină umană marcaţi fluorescent; se incubează; se spală.

Lectura: dacă anticorpul corespunde antigenului de pe frotiu, se formează un complex antigen-anticorp care rămîne fixat pe frotiu şi va reacţiona cu anticorpii anti-gamaglobulină umană marcaţi făcînd complexul vizibil la microscopul cu radiaţii ultraviolete (fig.5-12).

Tehnica indirectă de imunofluorescenţă este utilizată în serodiagnosticul unor infecţii (de exemplu, în serodiagnosticul sifilisului → 32.4.2.)

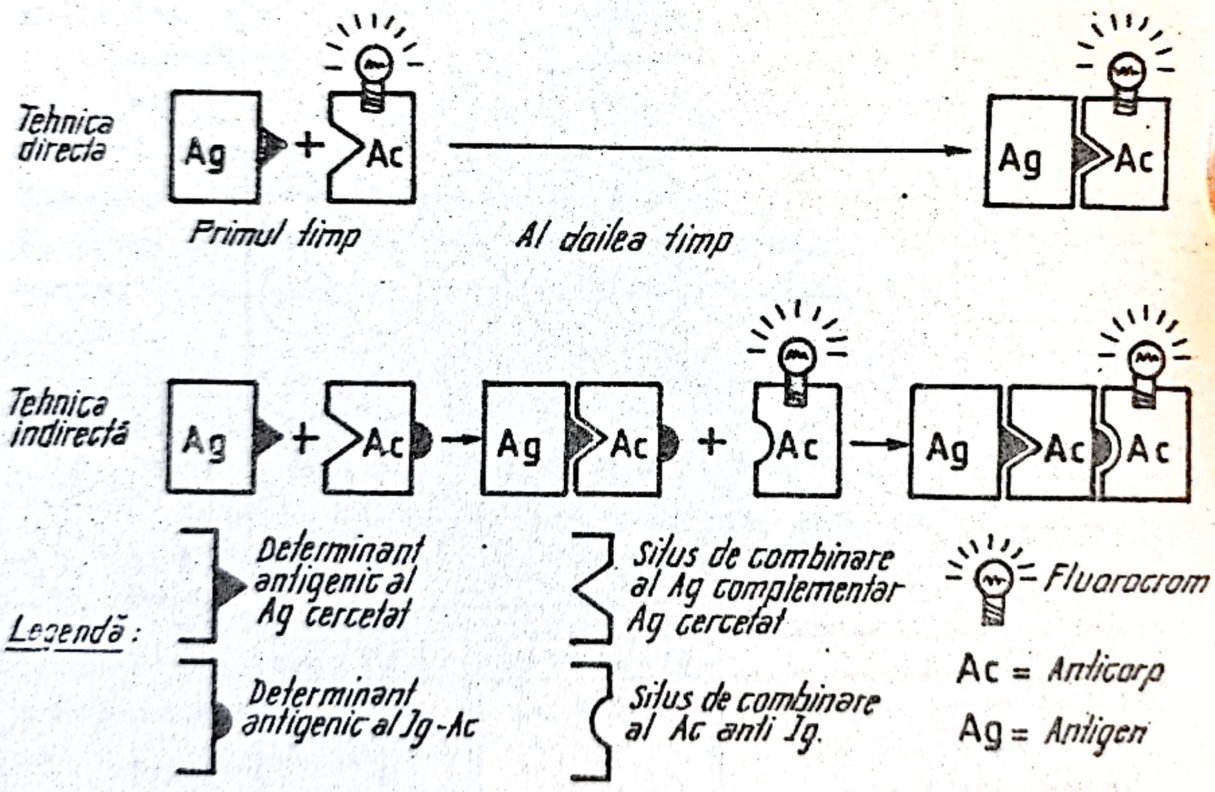


Fig.5-12 Schema imunofluorescenţei

5.3. Identificarea antigenică a microbilor

Microbii, prin structura lor, reprezintă mozaicuri de antigene. Unele dintre acestea au specificitate de gen, specie, grup sau tip şi sînt utile în identificarea microbilor (identificarea antigenică a microbilor).

Pentru identificarea antigenică a microbilor utilizăm seruri

imune de referinţă (seruri cu anticorpi cunoscuţi), care se obţin prin imunizarea animalelor de experienţă cu suspensii microbiene. Un ser imun brut astfel obţinut reacţionează nu numai cu tulpina microbiană homologă (cea cu care s-a făcut imunizarea animalului), ci cu toţi microbii înrudiţi antigenic cu aceasta prin antigenele de grup, specie, gen ş.a. pe care le posedă în comun (reacţii încrucişate). Pentru a fi utile în identificarea antigenică, serurile imune brute sînt în prealabil „adsorbite" cu tulpini heterologe pentru a îndepărta anticorpii responsabili de reacţiile încrucişate*) Un asemenea ser imun „adsorbit" se numeşte monospecific pentru că reacţionează numai cu tulpinile din acelaşi serotip sau serogrup cu tulpina homologă.

Uneori „adsorbţia" anticorpilor din serul imun nu este completă. In aceste cazuri reacţia cu antigenul homolog se realizează la titruri mari în timp ce reacţiile încrucişate apar numai la titruri mici. De aceea întotdeauna rezultatele reacţiilor de aglutinare pe lamă trebuie verificate prin metoda mai sensibilă a aglutinării în tub.

In cazul speciilor cu numeroase serotipuri sau serogrupe, pentru economie de timp, în identificarea antigenică se utilizează mai întîi seruri polivalente. Serurile polivalente conţin anticorpi faţă de mai multe serotipuri sau serogrupe ale microbului respectiv.

Utilizarea diferitelor reacţii antigen-anticorp în identificarea practică a microbilor este prezentată în capitolele 9-20.

BIBLIOGRAFIE

Berceanu St., Păunescu E. (1981): Biologia şi patologia imunităţii, Editura Academiei R.S.R., pp.57-58.

Boroş I., Moraru I., Onică D., Păunescu E., Sulica A. (1981): Dicţionar enciclopedic de imunologie, Editura Ştiinţifică şi Enciclopedică, Bucureşti.

Duca E., Duca M., Furtunescu G. (1979): Microbiologie medicală, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, pp.225-253.

Moroşanu V., Ionescu L., Ciubotaru V. (1979): Diagnosticul serologic al virozelor respiratorii folosind o singură probă de ser de la bolnav, prin diferenţierea cu 2-mercaptoetanol a

*) In serul imun brut se suspensionează tulpina sau tulpinile heterologe iar complexele antigen-anticorp heterologe sînt îndepărtate prin centrifugare. Operaţia se poate repeta.

Scanned with OKEN Scanner

PARTEA III-a

DIAGNOSTICUL ETIOLOGIC AL INFECTIILOR

Scanned with OKEN Scanner

6. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECTIILOR

DUMITRU T. BUIUC

6.1. Aspecte generale

6.1.1. Scopurile laboratorului de microbiologie clinică sînt de a preciza

- microbul care a cauzat o infecţie sau o epidemie;
- dacă o boală infecţioasă poate beneficia de tratament antimicrobian şi care sînt drogurile eventual utile.

6.1.2. Metodele prin care microbiologul realizează aceste scopuri sînt:

- metode directe, diagnosticul microbiologic (bacteriologic, micologic, virologic), care presupune
  - tehnici de depistare şi identificare microscopică,
  - tehnici de depistare şi identificare antigenică,
  - tehnici de izolare şi identificare pînă la nivel de gen, specie, tulpină a microbului infectant.
- metode indirecte, diagnosticul seroimunologic, care presupune
  - tehnici de depistare a anticorpilor apăruţi în cursul infecţiei.

Aceste metode impun

- recoltarea unor probe de produse patologice de la pacient (umori sau ţesuturi modificate biochimic, citologic sau microbiologic ca urmare a infecţiei);
- conservarea şi transportul lor la laboratorul competent.

6.1.3. Competenţele şi ierarhizarea laboratoarelor în raport cu competenţa. Nu orice laborator dispune de încadrarea şi dotările materiale necesare unui diagnostic complet al infecţiilor. De aceea Ministerul Sănătăţii a ierarhizat laboratoarele în raport cu competenţa lor pentru a realiza etape bine definite ale diagnosticului, cu finalizare terapeutică şi epidemiologică precise. Astfel laboratorul unui spital comunal realizează

- examenul şi identificarea microscopică a microbilor din

Scanned with OKEN Scanner

6.1.

produse patologice care se pot recolta la acest nivel (puroi, urină, spută ş.a.),

- conservarea şi transportul probelor către laboratorul ierarhic superior competent să realizeze izolarea şi identificarea microbilor pînă la nivel de gen, specie, tulpină (laboratorul de microbiologie clinică al spitalului orăşenesc, judeţean, universitar; laboratorul de microbiologie sanitară al Centrului judeţean sanitaro-antiepidemic ş.a.)

Medicul care beneficiază de serviciile unui laborator trebuie să cunoască limitele de competenţă ale acestuia.

6.1.4. Indicaţiile şi nivelul pînă la care se realizează diagnosticul de laborator în infecţii decurg din

● Posibilităţile terapiei antiinfecţioase. Dispunem de numeroase substanţe antimicrobiene cu largi posibilităţi de aplicare în bacterioze şi în micoze, dar posibilităţile chimioterapiei antivirale sînt încă foarte limitate.

● Complexitatea, costul tehnicilor puse în joc şi intervalul în care acestea pot realiza, în raport cu evoluţia infecţiei, diagnosticul etiologic. Depistarea şi identificarea virusurilor cere laboratoare cu dotări speciale şi tehnici costisitoare şi, de multe ori, necesită intervale mai lungi decît însăşi evoluţia multor viroze.

In bacterioze diagnosticul de laborator are cele mai largi indicaţii

- la bolnavi pentru alegerea terapiei antibacteriene şi, în cazul bacteriozelor cu potenţial epidemigen (febră tifoidă, holeră etc.), măsurilor de combatere antiepidemică (izolare, dezinfecţie, vaccinări în focar ş.a.);

- în supravegherea epidemiologică pentru depistarea purtătorilor sănătoşi de bacterii patogene (bacili tifici, dizenterici).

In micoze indicaţiile diagnosticului de laborator se restrîng la bolnavi pentru alegerea terapiei antimicotice.

In viroze indicaţiile diagnosticului de laborator vizează numai

- Bolile în care atitudinea terapeutică, profilactică sau pronosticul depind de un diagnostic etiologic precis. De exemplu, diagnosticul rubeolei la gravide, diagnosticul rabiei la animalul care a muşcat, diagnosticul infecţiei herpetice. Probabil în viitor sfera de cuprindere a acestei indicaţii se va extinde cores-

Scanned with OKEN Scanner

punzător lărgirii posibilităţilor chimioterapiei antivirale.

- Boli foarte grave sau/şi cu potenţial epidemigen important (poliomielita, febra galbenă, gripa ş.a.) v'zînd măsurile de combatere şi profilaxie antiepidemică în focar.

- Supravegherea epidemiologică a unor viroze. De exemplu, triajul donatorilor de sînge pentru virusul hepatitei B, anchete privind prevalenţa unor viroze într-o populaţie.

I n g e n e r a l, diagnosticul de laborator al marilor sindroame infecţioase plurietiologice (infecţii respiratorii acute, diarei infecţioase acute, meningite ş.a.) trebuie să vizeze în primul rînd, pentru consecinţele terapeutice, etiologia bacteriană (excluderea etiologie bacteriene) şi în al doilea rînd, în limita posibilităţilor, pe cea virală.

6.2. Diagnosticul bacteriologic

Conduita examenului bacteriologic şi criteriile de implicare etiologică a bacteriilor depistate sînt în funcţie de condiţia microbiologică a produselor patologice examinate. Sub acest raport reţinem 3 categorii de produse patologice

- produse patologice necontaminate: produse recoltate prin puncţia cavităţilor normal sterile ale organismului (sînge, lichid cefalo-rahidian, exsudatele seroaselor, exsudatele din sinusurile paranasale şi urechea medie, urina, bila ş.a.), probe tisulare bioptice;
- produse patologice contaminate cu microbiota indigenă a traiectelor de eliminare naturală (urina micţionată, sputa, bila recoltată prin aspiraţie duodenală ş.a.) sau patologică (puroiul drenat prin fistule);
- produse patologice contaminate i n s i t u : materii fecale, exsudat nasofaringian, vaginal, puroi din plăgi, arsuri ş.a.

6.2.1. Examenul macroscopic are o importanţă deosebită pentru probele de spută şi de materii fecale în care poate indica realul produs patologic sub forma porţiunilor fibrinopurulente(sanguinolente), granule riziforme, „granule de sulf".

6.2.2. Examenul direct microscopic (bacterioscopic şi citologic)

Examenul frotiurilor colorate diferenţial, Gram sau, în suspiciunea infecţiei tuberculoase, Ziehl-Neelsen permite depistarea

şi identificarea microscopică a bacteriei infectante (→ 2.2.2.2.2.) oferind

- clinicianului primul criteriu empiric pentru ghidarea antibioterapiei (a se revedea noţiunile: categorii microscopice ale bacteriilor, clasificarea antibioticelor după spectrul natural antibacterian, frecvenţa rezistenţei dobîndite la antibiotice printre tulpinile diferitelor specii într-o regiune şi moment dat, antibiotice de rezervă);

- microbiologului date utile pentru alegerea metodei de izolare.

Examenul preparatului între lamă şi lamelă poate identifica microbul infectant numai în puţine împrejurări: Borrelia recurrentis în plasma bolnavilor cu febră recurentă, Treponema pallidum în exsudatul şancrului tare, Actinomyces în „granulele de sulf" ale puroiului.

Examenul frotiurilor colorate cu albastru de metilen sau, mai util, Giemsa permite aprecierea caracterului reacţiei inflamatorii din focarul infecţios.

Examenul microscopic este un examen

- rapid, oferă rezultate în 1-2 ore după recoltarea probei;
- relativ puţin sensibil, în proba examinată trebuie să fie prezente $>10^5$ bacterii/ml pentru ca pe frotiu să se observe $\geqslant 1$ bacterie/cîmp microscopic IU. De aceea un examen bacterioscopic pozitiv are valoare diagnostică orientativă, dar unul negativ nu poate exclude infecţia bacteriană.

Examenul citologic, prin caracterele reacţiei inflamatorii depistate, orientează, în anumite limite, diagnosticul către cauzele acesteia:

- prezenţa predominantă a polimorfonuclearelor traduce un proces inflamator acut determinat cel mai frecvent de bacterii piogene;
- prezenţa predominantă a limfocitelor şi macrofagelor semnifică un proces inflamator viral sau cu bacterii facultativ intracelulare (bacilii tuberculozei, Brucella, Listeria monocytogenes);
- prezenţa în număr mare a eozinofilelor semnifică un proces inflamator alergic (de cauză infecţioasă sau neinfecţioasă).

In probele din produse patologice necontaminate, stabilirea şi identificarea microscopică a bacteriei infectante nu ridică

probleme decît sub raportul controlului coloraţiei diferenţiale aplicate (→ 2.2.2.2.2.) şi al sensibilităţii metodei.

Din contra, la examenul microscopic al probelor din produse patologice contaminate se ridică în primul rînd problema controlului calităţii probei. Pe frotiuri din probe contaminate putem proceda la stabilirea şi identificarea bacteriei infectante numai în măsura în care prin criterii obiective am apreciat că examinăm material din focarul de infecţie (inflamator) şi nu material de contaminare cu bacterii străine procesului inflamator infecţios:

- materialul din focarul de infecţie se caracterizează prin abundenţa celulelor inflamatorii (polimorfonucleare, limfocite sau macrofage),
- materialul de contaminare (contaminare orofaringiană a sputei şi bilei, contaminare vaginală a urinii micţionate, contaminare superficială a puroiului din plăgi, arsuri ş.a.) se caracterizează prin prezenţa celulelor epiteliale scuamoase eventual încărcate cu foarte numeroase bacterii de contaminare.
- Bacteria infectantă apare pe frotiu semnificativ asociată celulelor inflamatorii:

- printre celulele inflamatorii sau fagocitată (prezenţa ei se urmăreşte numai pe cîmpuri IU în care sînt >3 celule inflamatorii*) iar celulele scuamoase lipsesc, atît pe cîmpul examinat cît şi pe cele imediat vecine);

- în număr care îl depăşeşte pe cel al contaminării uzuale (≥1 bacterie/cîmp microscopic IU în urina necentrifugată; 1o-2o bacterii neacidorezistente/cîmp IU în spută). Există produse patologice care uzual nu sînt contaminate de către unele bacterii în cantităţi decelabile microscopic. De exemplu, sputa de către mycobacterii saprofite. De aceea prezenţa bacililor acidorezistenţi, indiferent de cantitate, pe frotiul din spută semnifică infecţia cu mycobacterii. Nu acesta este însă şi cazul sedimentului urinar în care contaminarea cu mycobacterii saprofite este decelabilă microscopic.

Aprecierea obiectivă a calităţii probelor din produse patologice contaminate. Stabilirea scorului „Q" de calitate microscopică a probei. Se examinează cu mărire de 100x frotiul colorat Gram. Se alege un cîmp cu dispersie relativ uniformă a celulelor.

*) O excepţie o face infecţia căilor urinare unde, datorită diurezei, numărul leucocitelor/cîmp microscopic IU poate fi mai mic.

6.2.

Se numără diferenţiat polimorfonuclearele sau alte celule inflamatorii şi celulele epiteliale scuamoase. Se acordă calificative conform tabelului 6-1.

Tabelul 6-1

Calificativele pentru stabilirea scorului „Q" de calitate microscopică a probelor destinate examenului bacteriologic (după Bartlett şi colab., 1979)

Număr celule/ cîmp microscopic 100x	Calificative pentru celulele inflamatorii		Calificative pentru celule scuamoase
	Spută	Alte produse	Toate produsele
0	0	0	0
1- 9	0	+1	0
10-24	+1	+2	-1
25	+2	+2	-2

Scorul „Q" de calitate = (Σ calificativelor pentru celule inflamatorii şi celule scuamoase) + 1

De exemplu, o probă de spută pentru care examenul microscopic evidenţiază/cîmp microscopic 100x >25 polimorfonucleare şi numai 6 celule epiteliale scuamoase are scorul de calitate „Q" = +3, rezultat din (+2)+0+1.

Probele care realizează un scor „Q" <+1 sînt respinse de la examenul bacteriologic iar medicul care a solicitat examenul este anunţat: „Probă cu contaminare masivă, improprie pentru examenul bacteriologic. A se repeta recolta". Probele care realizează un scor „Q" ⩾+1 se examinează în continuare.

6.2.3. Depistarea antigenelor bacteriene în umori şi exsudate (l.c.r., spută ş.a.) prin imunelectroforeză contracurent (→ 5.2.1.1.2.2.) este o metodă rapidă de diagnostic cu sensibilitate intermediară între examenul microscopic şi izolarea bacteriei infectante. La pacienţi supuşi antibioterapiei carbe, sensibilitatea depistării antigenice o depăşeşte chiar şi pe cea a izolării.

6.2.4. Izolarea are drept scop obţinerea în cultură pură a bacteriei infectante. Este cea mai sensibilă metodă de depistare a bacteriilor. Curent, se realizează i n v i t r o pe medii de cultură. Mai rar, se face i n v i v o prin inoculare la animale.

6.2.4.1. Izolarea pe medii de cultură

Alegerea mediului de cultură şi a condiţiilor de incubare sînt dictate de produsul patologic examinat, datele clinice şi

cele ale examenului direct microscopic.

Din probe necontaminate bacteria infectantă poate fi obţinută pură în cultură primară prin utilizarea, după caz, a mediilor solide sau/şi lichide.

Medii solide. Uzual, pentru spectrul larg al posibilităţilor de izolare pe care îl oferă, se foloseşte geloza-sînge în plăci Petri. Alte medii se folosesc numai cînd există indicaţii speciale.

Medii lichide. Pot fi însămînţate cu un volum mai mare din probă ceea ce permite izolarea din probe în care numărul bacteriilor viabile este foarte redus. Cel mai utilizat este bulionul glucozat. De la caz la caz se poate recurge şi la alte medii speciale. Utilizarea mediilor lichide impune cele mai riguroase condiţii de asepsie la recoltarea şi manipularea probelor deoarece contaminarea, chiar minimă, cu un saprofit de pe tegumente sau din aer este mai greu de sesizat decît pe medii solide şi denaturează rezultatele examenului.

Din probe contaminate izolarea se face exclusiv pe medii solide. Succesul izolării bacteriei infectante depinde de calitatea probei, ca şi de eficienţa procedeelor de decontaminare aplicabile probei prealabil însămînţării.

Metode de decontaminare mecanică se aplică exsudatelor purulente fibrinoase. Fragmentele fibrinopurulente din spută, materii fecale sînt spălate în 3-4 băi succesive de soluţie salină izotonă sterilă.

Metode de decontaminare chimică a probei. De exemplu, distrugerea bacteriilor neacidorezistente în scopul izolării bacililor tuberculozei.

Metode de inhibare a dezvoltării bacteriilor de contaminare. Se folosesc medii selective pentru o anume bacterie patogenă (bacil difteric, Salmonella, Shigella ş.a.) In eventualitatea unui număr redus de bacterii patogene, se recurge la însămînţarea şi incubarea prealabilă a probei într-un mediu de îmbogăţire cu repicare ulterioară pe mediul selectiv corespunzător.

Cu cît o probă este mai intens contaminată impune metode mai drastice de decontaminare, care pot afecta viabilitatea unor patogeni. De aceea sensibilitatea metodelor de izolare a patogenilor creşte cînd asigurăm o contaminare cît mai redusă chiar în momentul recoltării acestor probe.

Scanned with OKEN Scanner

6.2.

6.2.4.2. Izolarea prin inoculare la animale de laborator sensibile constituie adesea şi metodă de identificare a infectantului. O cantitate din probă se inoculează subcutanat sau intraperitoneal la animalul specific sensibil: şoarecele pentru pneumococi, Klebsiella pneumoniae, Francisella tularensis ş.a., cobaiul pentru bacilul tuberculozei, leptospire, rickettsii. La animalul astfel infectat experimental bacteria infectantă este depistată microscopie în sînge şi organe (amprente de splină, ficat) şi prin hemocultură.

6.2.5. Identificarea bacteriilor izolate (→ capitolele 11-18)

Studiind circumstanţele izolării, caracterele microscopice, caracterele de cultură şi activitatea biochimică, microbiologul, prin comparaţie cu un sistem cunoscut de unităţi taxonomice, încadrează pe rînd izolatul într-o familie, gen, specie (îi dă un nume) Dar aceasta nu este de ajuns. Microbiologul mai trebuie să individualizeze tulpina izolată şi sub raportul sensibilităţii la antibiotice şi al unor markeri cu semnificaţie epidemiologică: serotip, lizotip ş.a. In laboratorul de microbiologie medicală nivelul pînă la care se conduce identificarea unei bacterii şi ordinea de studiu a caracterelor sînt subordonate necesităţilor clinice (diagnostic şi terapie), epidemiologice şi posibilităţilor economice. Astfel, pentru izolaţii cu semnificaţie clinică se poate face antibiograma înaintea identificării speciei; în funcţie de competenţa laboratorului şi imprejurarea clinică identificarea se poate opri la nivelul de categorie microscopică sau gen; dacă necesităţile epidemiologice nu o impun, markerii epidemiologici nu sînt identificaţi.

6.2.6. Semnificaţia clinică a bacteriilor izolate: criterii de implicare etiologică. Implicarea unei bacterii drept cauză a infecţiei se bazează pe o sumă de criterii care ţin atît de produsul patologic examinat cît şi de bacteria izolată.

Cazul produselor necontaminate. Criteriul major de implicare etiologică este însăşi izolarea în cultură pură a unei bacterii patogene. De exemplu, izolarea din sînge a bacilului tific, izolarea din l.c.r. a meningococului, a pneumococului)

Pentru bacteriile accidental patogene ubicuitare pe tegumente (Staphylococcus epidermidis, Propionibacterium acnes) trebuie

aduse dovezi suplimentare care elimină posibilitatea contaminării probei în cursul recoltării:

- izolarea repetată, în condiţiile respectării unei asepsii stricte, a aceleeaşi bacterii;
- depistarea unei bacterii cu aceleaşi caractere microscopice la examenul direct;
- contextul clinic (dacă este recunoscută posibilitatea implicării accidental patogenului izolat în infecţii asemănătoare cu cea investigată).

De exemplu, izolarea repetată a S.epidermidis în hemocultură la un pacient cu endocardită subacută după intervenţie chirurgicală pentru protetizarea valvulelor cardiace.

Cazul probelor contaminate cu microbiota indigenă a traiectelor de eliminare. Criteriul de implicare etiologică a bacteriilor patogene absente normal în flora de contaminare a acestor probe este însăşi izolarea lor. De exemplu, izolarea bacilului tuberculozei din spută sau din urină.

Bacteriile condiţionat patogene, care contaminează normal aceste probe, sînt implicate etiologic pe baza criteriului cantitativ: bacteriile multiplicate la nivelul leziunii sau în cavitatea din care provine proba (mucoasa urinară şi urina, mucoasa şi exsudatul căilor respiratorii inferioare) sînt prezente în probă în cantităţi semnificativ mai mari decît contaminanţii normali. Cînd bacteria izolată în asemenea cantităţi se asociază unui proces inflamator demonstrat microscopic sîntem în faţa unei infecţii. Cînd o asemenea asociere lipseşte sîntem în faţa unei simple colonizări abortive a cavităţilor din care provine proba (colonizarea urinii ş.a.). Pentru a face operant criteriul cantitativ de diagnostic se impun măsuri speciale de reducere a contaminării cu ocazia recoltării, de decontaminare a probei (cînd proba se pretează la o asemenea operaţie, de exemplu sputa) şi de prevenire a multiplicării bacteriilor în probă în intervalul recoltare-examinare.

Cazul produselor din zone normal contaminate. Identificarea integrală a izolaţilor din asemenea probe este inutilă. Se urmăresc principalele bacterii patogene în funcţie de sindromul clinic. Absenţa din probă a unei bacterii înalt patogene care să explice tabloul clinic obligă la investigarea rolului etiologic al unora dintre bacteriile condiţionat patogene izolate sau al unor micete ori virusuri. Implicarea etiologică a condiţionat pa-

6.2.

togenilor izolaţi în aceste situaţii se face pe baza
- criteriului cantitativ (bacteriile care ajung anormal predominante într-un produs patologic trebuie investigate pentru factori de patogenitate care să explice eventuala lor implicare etiologică);
- testelor de patogenitate (de exemplu, izolarea unei tulpini de Escherichia coli enterotoxigenă sau enteroinvazivă din scaunul diareic);
- autoserodiagnosticului (apariţia sau creşterea în cursul bolii a titrului anticorpilor faţă de izolatul suspicionat ca infectant).

6.2.7. Testarea sensibilităţii bacteriei infectante la antibiotice. Puţine au rămas bacteriile care şi-au păstrat nemodificată sensibilitatea naturală pentru antibioticele de elecţie (de exemplu, Streptococcus pyogenes, Treponema pallidum, leptospirele - sensibilitatea la penicilina G). De aceea, după izolarea bacteriei infectante microbiologul efectuează antibiograma acesteia pentru a afla antibioticele eventual utile în terapia infecţiei investigate. Rezultatul antibiogramei este furnizat de laborator ca al II-lea criteriu empiric de ghidare a antibioterapiei.

Pentru izolaţii cu semnificaţie clinică, apreciată pe baza criteriilor tocmai enunţate, rezultatul antibiogramei poate fi şi trebuie comunicat înaintea identificării lor complete care poate dura mai multe zile.

> Este ilogic şi periculos pentru bolnav a efectua antibiograma pentru orice bacterie izolată dintr-un produs patologic (mai ales din cele normal contaminate) înainte de a argumenta cu suficiente dovezi semnificaţia ei clinică.

Detalii tehnice privind testarea sensibilităţii bacteriilor la antibiotice sînt prezentate în capitolul 8.

I n c o n c l u z i e ,

Microbiologul trebuie să cunoască precis şi să comunice etapizat (telefonic sau în scris) rezultatele cu semnificaţie clinică ale examenului bacteriologic: identificarea microscopică a infectantului, antibiograma pe primo- sau subcultură ş.a.

Clinicianul trebuie să cunoască intervalele de timp în care poate primi rezultatele cu semnificaţie clinică ale examenului

microbiologic (tabelul 6-2).

Tabelul 6-2

Intervalele de timp în care poate fi comunicat rezultatul unor etape cu semnificaţie clinică ale examenului microbiologic

Etapa	Intervalul de timp
Depistarea şi identificarea microscopică:	
Frotiu Gram	1 oră
Coloraţii pentru bacilii acidorezistenţi	2 ore
Depistarea şi identificarea antigenică:	
Imunelectroforeză contracurent	1 oră
Microscopie cu anticorpi marcaţi	1 oră
Izolarea şi identificarea:	
Bacterii cu creştere rapidă	2-7 zile
Idem - antibiograma	8 ore*) - 8 zile
Micobacterii	4 - 8 săptămîni
Idem - antibiograma	4*) - 16 săptămîni
Bacterii anaerobe	2-14 zile
Brucella	21 zile
Leptospire	30 zile
Fungi	4-6 săptămîni
Virusuri	3 zile - 4 săptămîni

*) Dacă este posibilă antibiograma pe cultură primară (→ 8.1.3.)

6.3. Diagnosticul micologic are la bază aceleaşi etape şi norme de interpretare ca şi diagnosticul bacteriologic al infecţiilor cu bacterii condiţionat patogene.

6.4. Diagnosticul virologic este accesibil numai unui număr restrîns de laboratoare.

6.4.1. Tehnicile directe de depistare a virusurilor, în general mai puţin sensibile decît cele de izolare, sînt tehnici rapide. Tocmai pentru avantajul rapidităţii capătă o pondere deosebită în diagnosticul virozelor (tabelul 6-2). Microscopul optic depistează modificări cito- şi histopatologice specific induse de virusuri (incluzii), microscopul electronic poate depista virionii, reacţiile cu anticorpi marcaţi, enzimatic sau radioactiv (cele mai sensibile), fluorescent sau electronoopac, depistează antigenele virale.

6.4.2. Izolarea virusurilor în culturi de celule, pe embrioni de

găină sau pe animale de laborator cu identificarea provizorie pe baza efectelor citopatic, hemaglutinant ş.a. (→capitolele 4 şi 2o) poate necesita de la cîteva zile la cîteva săptămîni. La acest interval se adaugă apoi cel necesar identificării complete a virusului izolat. Cum izolarea virusurilor se face pe gazde vii, nu este o excepţie ca uneori în final să se izoleze un virus propriu acestor gazde şi nu produsului patologic investigat. De aceea în caz de dubiu trebuie aduse dovezi suplimentare pentru implicarea etiologică a virusului izolat prin reizolarea aceluiaşi virus din produsul patologic conservat iniţial şi prin autoserodiagnostic.

6.5. Diagnosticul seroimunologic

Pentru depistarea anticorpilor la bolnav se recurge la

- teste i n v i t r o: diagnosticul serologic;
- teste i n v i v o: teste intradermice (idr) pentru depistarea stărilor de sensibilizare de tip întîrziat (idr la tuberculină, brucelină, lepromin ş.a.), teste idr de receptivitate (idr Schick, Dick).

Cercetarea anticorpilor în scop diagnostic apare indicată:

(i) în infecţii în care agentul etiologic nu poate fi izolat, fie din cauză că se află cantonat în focare inabordabile pentru prelevări de probe (sifilis latent, bruceloză în stadiu cronic), fie pentru că nu avem posibilităţi curente de cultivare (viroze) sau nu poate fi cultivat (infecţia sifilitică);

(ii) în toate cazurile în care nu a fost posibilă izolarea microbului infectant (investigarea bolnavului după dispariţia microbului infectant din produse patologice abordabile ş.a.);

(iii) în cazurile în care avem dubii asupra rolului etiologic al microbului izolat (autoserodiagnostic);

(iv) ori de cîte ori urmărim reactivitatea imunologică a unui pacient: capacitatea de a elabora un răspuns imun umoral sau celular. Pacienţii cu agamaglobulinemie nu posedă şi nu formează anticorpi umorali. Pacienţii cu lepră lepromatoasă dau idr la lepromin negativă.

6.5.1. Diagnosticul serologic

Avînd în vedere că în serul oricărui individ normal există anticorpi în raport cu infecţiile şi vaccinările din antecedentele

sale, trebuie demonstrată legătura cauzală între anticorpii depistaţi şi infecţia investigată. Pentru aceasta dispunem de trei criterii:

- criteriul dinamicii semnificative a anticorpilor,
- criteriul titrului semnificativ al anticorpilor,
- dozarea anticorpilor cu apariţie precoce, anticorpii IgM

Criteriul dinamicii semnificative a anticorpilor este criteriul uzual şi recomandat. Impune recoltarea a 2 probe de ser: prima (ser I) la diagnosticarea clinică a infecţiei şi a doua (ser II) după 10-14 zile de la prima recoltare.

> Etiologia unei infecţii este demonstrată cînd anticorpii faţă de un anume microb
> - nu sînt prezenţi în serul I dar îşi fac apariţia în serul II sau
> - titrul lor creşte de cel puţin 4 ori în serul II faţă de serul I (fig.6-1).
>
> In infecţii cronice, cum este sifilisul, dinamica descendentă a anticorpilor este folosită ca un criteriu de vindecare a infecţiei (fig.31-1).

In practică se lucrează cu baterii care reunesc antigenele celor mai frecvenţi agenţi etiologici ai diferitelor sindroame infecţioase. De exemplu, bateria de antigene pentru diagnosticul serologic al infecţiilor respiratorii trebuie să includă următoarele antigene: Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia psittaci, Coxiella burneti, gripale, adenovirale, paragripale, virus respirator sincitial.

Criteriul titrului semnificativ al anticorpilor se utilizează în cazurile în care criteriul dinamicii semnificative nu este operant. Aşa este cazul antistreptolizinei O (ASLO) în infecţia streptococică. Imunitatea în infecţia streptococică este o imunitate de tip asigurată de anticorpii anti-proteină M. Ori multiplele serotipuri M ale S.pyogenes produc o streptolizină O identică antigenic. De aceea în serul oricărui individ normal există un titru ASLO de fond (urmarea repetatelor infecţii streptococice din antecedente), care nu depăşeşte însă 200 U/ml. După o infecţie streptococică recentă titrul ASLO creşte peste 200 U/ml (titru semnificativ).

Dozarea anticorpilor IgM. In răspunsul imun faţă de multe antigene anticorpii IgM apar primii fiind înlocuiţi progresiv în decursul a 1-2 săptămîni de anticorpi IgG. Agenţi reducători, ca 2 mercaptoetanolul (2-ME), distrug funcţia anticorp a IgM dar nu

o afectează pe cea a IgG. Dacă într-o probă de ser tratată cu 2-ME titrul anticorpilor scade comparativ cu martorul (aceeaşi probă netratată), anticorpi IgM sînt implicaţi în reacţie. Criteriul este aplicabil numai în acele infecţii în care există o dinamică bine exprimată a claselor IgM şi IgG în răspunsul imun: infecţii virale, sifilis. Nu este aplicabil în infecţii cu bacili gram-negativi la care răspunsul imun faţă de antigenul O este predominant şi persistent cu anticorpi IgM (de exemplu, anticorpii anti-O în febrele enterice).

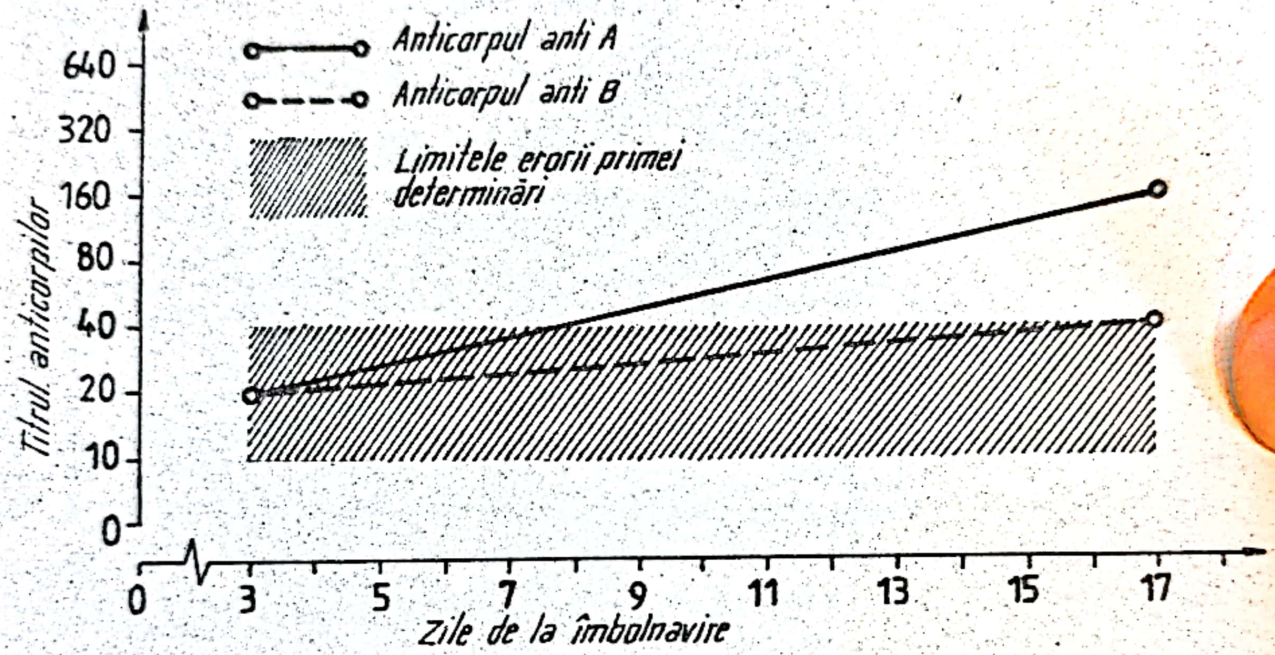


Fig.6-1 Criteriul dinamicii semnificative a anticorpilor, ilustrare schematică. Titrul anticorpilor anti-A creşte de 8 x în interval de 14 zile. Titrul anticorpilor anti-B rămîne staţionar. Infecţia actuală este cauzată de microbul A.

Sensibilitatea reacţiilor antigen-anticorp uzuale permite decelarea anticorpilor numai după cîteva zile de la debutul infecţiei. De aceea, de cele mai multe ori diagnosticul serologic este un diagnostic retrospectiv. El are o valoare actuală în asistenţa bolnavului numai în infecţiile cu evoluţie prelungită sau cronică (de exemplu, sifilis, bruceloză) sau în acele infecţii în care întîrzierea diagnosticului cu cîteva zile nu influienţează semnificativ conduita terapeutică (de exemplu, rubeola gravidei).

6.5.2. Teste intradermice pentru depistarea sensibilizării de tip întîrziat. In unele infecţii cronice (tuberculoză, bruceloză, lepră), cînd examenul microbiologic rămîne negativ sau este inprac-

ticabil, cercetarea sensibilizării poate aduce date utile pentru diagnostic. Pentru aceasta se inoculează intradermic mici cantităţi, determinate de antigen (antigene purificate sau culturi ori ţesuturi infectate şi inactivate). Sensibilizarea de tip întîrziat se dezvoltă după 4-8 săptămîni de evoluţie a infecţiei şi persistă mult timp după vindecarea bolii. De aceea rezultatele acestor teste trebuie interpretate cu prudenţă. O reacţie negativă la un antigen exclude infecţia prin microbul corespunzător (cu condiţia ca pacientul să posede capacitatea răspunsului imun pe linie celulară). Surprinderea virajului de la negativ la pozitiv a reacţiei faţă de un antigen aduce cert dovada etiologiei infecţiei.

BIBLIOGRAFIE

Bartlett R.C., Tetrault J., Evers J., Officer J., Derench J. (1979): Quality assurance of Gram-stained direct smears. Am.J.Clin.Pathol. 72:984.

D'Amato R.F., Holmes B., Bottone E.J.(1981): The systems approach to diagnostic microbiology. CRC Critical Rev.Microbiol. 9:1.

Duca M. (1979): Probleme şi posibilităţi actuale în diagnosticul de laborator al infecţiilor virale. Bacteriol.Virusol. Parazitol.Epidemiol. 24:65.

Duca M., Duca E., Bernescu E., Moroşanu V. (1976): Criterii pentru utilizarea unei tehnici unice de fixare a complementului în serodiagnosticul bolilor infecţioase (virale, bacteriene, micotice şi parazitare) şi în studiul bolilor imunologice. Rev.Med.Chir. (Iaşi) 80:283.

Edberg S.C. (1981): Methods of quantitative microbiological analyses that support the diagnosis, treatment and prognosis of human infection. CRC Critical Rev.Microbiol. 8:339.

Fenner J.F., White D.O. (1976): Medical Virology, ed.II-a, Academic Press, New York, pp.255-284.

O.M.S. (1978): Progrès en matière de diagnostic rapide des infections virales: Mémorandum. Bull.O.M.S. 56:761.

Washington II J.A. (1979): The clinician and the microbiology laboratory. Bacteria, fungi and parasites. In Mandell G.L., Douglas R.G., Bennett J.E. (editori): Principles and practice of infectious diseases, John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, pp.129-174.

White A. (1979): Serologic diagnosis. Op.citată pp.192-2oo.

Scanned with OKEN Scanner

7. PRINCIPII SI NORME IN RECOLTAREA SI TRANSPORTUL PROBELOR DESTINATE EXAMENELOR MICROBIOLOGICE SI SEROLOGICE

DUMITRU T. BUIUC şi MIRCEA GH. ALEXANDRESCU

Pentru diagnosticul de laborator al bolilor infecţioase se examinează probe recoltate din cele mai variate zone ale organismului, fiecare cu condiţia sa microbiologică proprie. Dacă la aceasta adăugăm şi diversitatea microbilor infectanţi, înţelegem de ce rezultatele examenelor de laborator în diagnosticul etiologic al bolilor infecţioase depind de

- recoltarea şi transportul corecte ale probelor,
- un schimb fluent de informaţii între microbiolog şi clinician,
- sensibilitatea şi fiabilitatea tehnicilor utilizate.

> Recoltarea şi transportul probelor către laboratoarele de microbiologie şi serologie trebuie făcute de către personal special instruit.

Sarcina acestei instruiri revine microbiologului care are şi îndatorirea de a semnala imediat orice deficienţă apărută.

7.1. Alegerea produselor patologice şi a momentului pentru recoltarea probelor

> Probele destinate examenului microbiologic se recoltează din zone şi în momentul în care este cel mai verosimil a fi găsit microbul infectant.

Produsele patologice şi momentul pentru recoltarea probelor sînt stabilite în funcţie de datele clinice şi patogenia infecţiei suspectate.

De la nivelul organului în suferinţă se recoltează uzual probele destinate examenului microbiologic: într-un abces se recoltează puroiul, într-o meningită - lichidul cefalo-rahidian (l.c.r.) într-o infecţie bronhopulmonară - sputa, iar într-o enterită - materiile fecale.

In alegerea produsului patologic trebuie să se ţină seama şi de

7.1.

- poarta de intrare a infecţiei,
- căile de răspîndire şi
- căile de eliminare din organism a microbului infectant:

într-o meningită virală se examinează l.c.r. (suferinţă meningeală), sîngele (calea de răspîndire a virusului în organism), materiile fecale (intestinul este poarta de intrare şi calea de eliminare din organism a enterovirusurilor, agenţi etiologici frecvenţi ai meningitelor virale); într-o febră enterică se examinează materiile fecale, sîngele, măduva osoasă, urina, iar în convalescenţă şi bila.

Stadiul bolii influenţează hotărîtor posibilitatea izolării microbului infectant dintr-un produs sau altul: în febra tifoidă procentul izolării bacilului tific în hemocultură scade de la 80-90% în prima săptămînă de boală la numai 10% în săptămîna a 4-a, în schimb, în acelaşi interval, procentul izolărilor în coprocultură creşte de la 10-15% la 75%

Probele trebuie recoltate din realul produs patologic.

Sîngele, l.c.r., urina nu ridică probleme din acest punct de vedere: microbul infectant este uniform dispersat în masa produsului. O atenţie deosebită trebuie acordată probelor de spută, materii fecale, exsudate de pe suprafaţa mucoaselor, a plăgilor, arsurilor. Dacă în loc de spută se trimite laboratorului salivă, în loc de exsudatul fibrino-purulent (sanguinolent) din materiile fecale se recoltează fragmente la întîmplare, materii fecale stagnante hipercontaminate, dacă în loc de exsudat faringian se trimite un tampon îmbibat cu salivă, un răspuns util din partea laboratorului este imposibil.

Utilă este practica de a recolta de la pacienţii cu boală febrilă de etiologie necunoscută odată cu probele pentru examenul microbiologic şi o probă de ser. Aceasta va fi serul I, care împreună cu serul II, recoltat după 10-14 zile, vor permite

- diagnosticul serologic în eventualitatea unui rezultat microbiologic negativ sau
- confirmarea serologică a unui rezultat microbiologic asupra căruia există dubii.

7.2. Norme de bază pentru recoltarea probelor destinate examenului microbiologic

(i) Recoltarea probelor se face înaintea instituirii oricărui tratament antimicrobian.

Examenul bacterioscopic se poate negativa chiar sub o antibioterapie ineficientă, iar caracterele microscopice ale bacteriilor se modifică frecvent. Izolarea bacteriei infectante din l.c.r. devine imposibilă după 24 ore de antibioterapie. In salmonelloze coproculturile sînt negative pe parcursul administrării de antibiotice pentru a se pozitiva frecvent după sistarea antibioticului. Cînd această precauţie, în mod excepţional, nu a putut fi respectată, se va anunţa laboratorul pentru a încerca (cu şanse reduse) neutralizarea antibioticului (penicilina prin penicilinază, sulfamidele prin acid paraaminobenzoic, aminoglicozidele prin polianetolsulfonat de sodiu) şi a interpreta corect rezultatele examenului microbiologic.

> Oricît de gravă ar fi o infecţie şi oricît de mare urgenţa terapiei antimicrobiene, întotdeauna se pot şi trebuie găsite cîteva minute, înaintea administrării primei doze de antibiotic, pentru a recolta corect probe destinate examenului microbiologic.

(ii) Probele trebuie recoltate în cantitate suficientă. Este o practică greşită, din păcate încă frecvent întîlnită, aceea de a înlocui probele de exsudate fluide (puroi şi altele), probele bioptice sau cele de chiuretaj a unor leziuni printr-un simplu tampon, care prelevă şi vehiculează o cantitate de produs patologic insuficientă pentru frotiuri şi însămînţări corecte (→7.3.) Aspectul este de reţinut mai ales pentru leziunile sărace în microbi cum sînt cele cronice.

(iii) Recoltarea probelor se face aseptic. Trebuie prevenite

- Contaminarea probelor cu microbi din mediul extern. Recoltarea se face cu instrumentar şi în containere sterilizate după spălare foarte îngrijită. Microbi de contaminare, chiar neviabili, denaturează rezultatele examenului bacterioscopic.

- Contaminarea probelor cu microbiota indigenă a tegumentelor şi mucoaselor. Recoltarea prin punctie-aspiraţie expune probele din zone normal sterile (sînge, exsudate din cavităţile seroase) contaminării cu microbiota rezidentă a tegumentului (*Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes*). Pentru a reduce riscul

acestei contaminări, puncţia se va face numai prin tegument antiseptizat riguros şi în final uscat cu eter iar proba se va descărca din seringă după ce s-a schimbat cu un ac nou acul cu care s-a făcut puncţia (→ 21.3.)

Pentru probele care traversează zone normal contaminate sau provin din asemenea zone ne limităm la o reducere cît mai eficientă a microbiotei de contaminare prin spălare cu apă sterilă sau soluţie salină izotonă a suprafeţelor mucoase sau a leziunilor cu îndepărtarea secreţiilor şi exsudatului stagnante hipercontaminate. Cele mai dificile probleme de recoltare, examinare şi interpretare a rezultatelor le pun pacienţii colonizaţi, ca urmare a unor boli de fond sau antibioterapiei, cu bacili gram-negativi dintre care se recrutează şi infectanţii (enterobacteriacee, bacil piocianic ş.a.) De multe ori diagnosticul nu poate fi rezolvat la asemenea pacienţi decît prin metode de recoltare care ocolesc căile naturale de eliminare a produselor patologice (metode invazive de recoltare): aspiraţie transtraheală pentru recoltarea exsudatului bronşic, aspiraţie suprapubiană pentru recoltarea urinii

- Orice posibilitate de infectare a bolnavului în timpul recoltei, a personalului şi a mediului în cursul transportului probelor. Probele se introduc aseptic în containere sterile închise ermetic. Foarte periculoasă este contaminarea suprafeţei externe a containerelor cu spută şi materii fecale. Nici sîngele şi nici celelalte umori ale organismului nu sînt inofensive, chiar cînd provin de la pacienţi fără infecţii aparente sau nu sînt destinate examenului microbiologic (pericolul transmiterii hepatitei serice !). Pentru prevenirea acestor contaminări este necesară educarea permanentă şi controlul vigilent al personalului în subordine.

(iv) Probele trimise spre analiză trebuie însoţite de date informative suficiente. Aceste date sînt cuprinse în buletinul de analiză sau, în cazul anchetelor epidemiologice, în tabele nominale Semnificaţia datelor informative se grupează astfel

- date necesare pentru identificarea probei: numele, prenumele, vîrsta bolnavului, data recoltei, spitalul, clinica, secţia/ salonul;

- date necesare alegerii celor mai adecvate tehnici de prelucrare a probei: diagnosticul prezumtiv, natura probei, examenul solicitat (în termeni cît mai precişi), precizarea dacă este vorba de bolnav (se va preciza şi data debutului bolii), convalescent sau purtător, precizări asupra antibioterapiei eventuale;

- date pentru precizarea responsabilităţii recoltării şi transportului: ora efectuării recoltei, data şi ora primirii în laborator, medicul care a recomandat analiza şi persoana care a făcut recolta şi a asigurat transportul.

De o importanţă capitală în identificarea probelor este etichetarea lor. Cea mai sigură şi mai simplă este eticheta din leucoplast. Pe etichete se notează cu creionul negru sau pixul cu bilă: numele şi prenumele pacientului, produsul patologic şi data recoltei sau, în anchetele epidemiologice, numărul corespunzător numelui pacientului în tabelul nominal.

7.3. Containere şi instrumente

Pentru recoltarea probelor se pot folosi, după caz, cutii Petri, eprubete, flacoane cu gura largă, borcane de sticlă de diferite capacităţi (loo-25o ml) prevăzute cu capac. În vederea utilizării, toate aceste recipiente trebuie să fie foarte bine spălate. Atît instrumentarul cît şi containerele destinate recoltării probelor pentru examenul microbiologic se sterilizează exclusiv prin agenţi fizici. Este formal contraindicată utilizarea agenţilor chimici: urme din aceste substanţe sînt nocive pentru microbi.

Un instrument des utilizat pentru recoltarea şi transportul

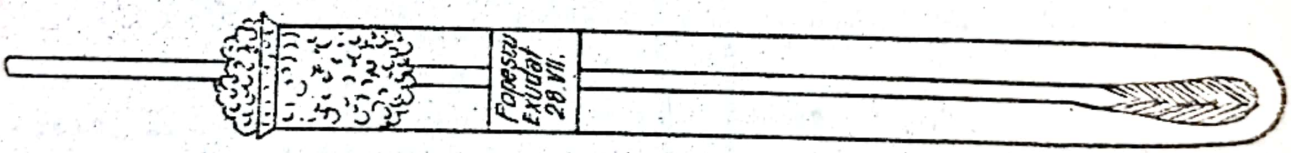


Fig.7-1 Tamponul de vată

probelor este tamponul de vată (recoltarea exsudatelor de pe suprafeţele mucoase, plăgi, arsuri). In mare măsură succesul examenului microbiologic depinde de utilizarea inteligentă şi corectă a tamponului. Tamponul se compune din aplicator şi tamponul propriuzis (fig.7-1). Ambele componente trebuie să fie lipsite de inhibitori microbieni. Aceştia pot fi ionii metalici din aplicator şi acizii graşi din vată. De aceea la confecţionarea tampoanelor

7.3.

- se preferă aplicatorul de lemn celui din sîrmă de aluminiu;
- se tratează vata pentru neutralizarea inhibitorilor sau se înlocuieşte cu alginat de calciu. Pentru îndepărtarea inhibitorilor din tampoanele de vată acestea, după confecţionare, sînt imersate în soluţie de tampon Sörensen pH 7,2 la fierbere, uscate la 37°C, introduse în tuburi de sticlă prevăzute cu dop de vată şi sterilizate la autoclav. Dopul trebuie să fie dens, pentru a preveni contaminarea şi desicarea probei.

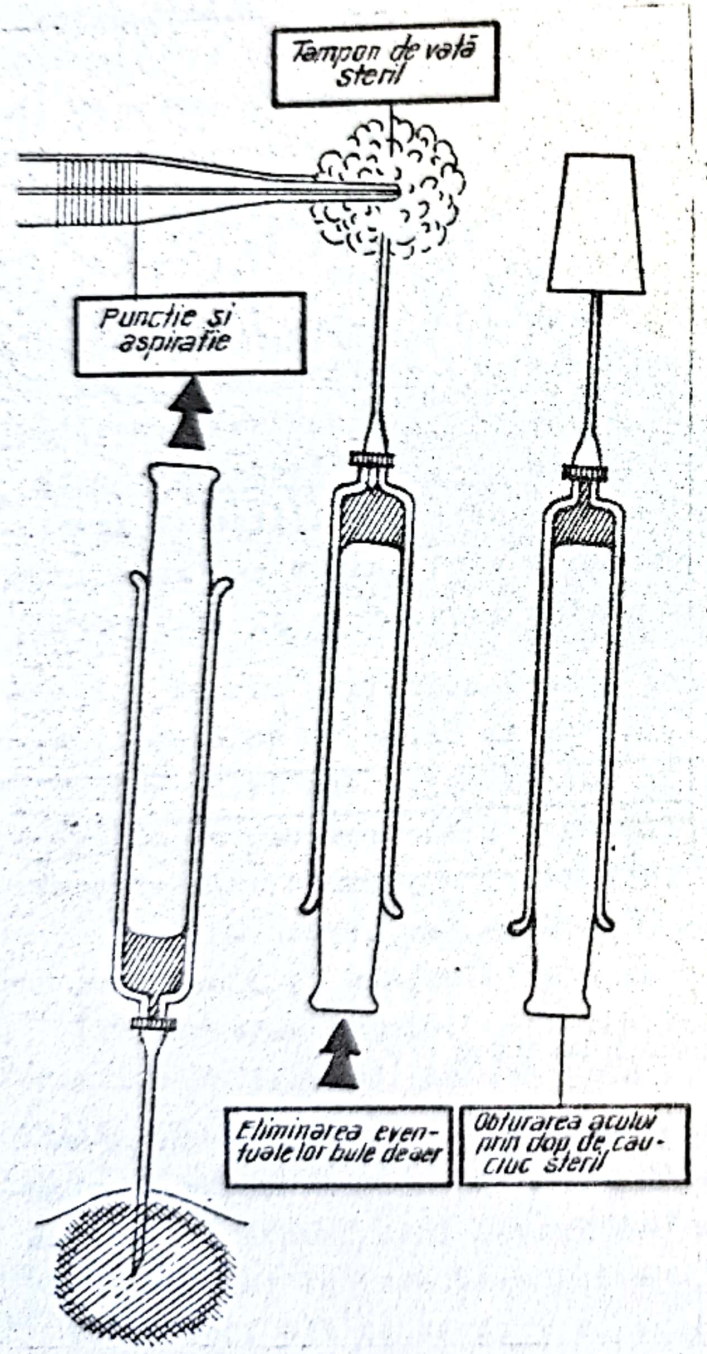


Fig.7-2 Recoltarea şi transportul în seringă a probelor destinate izolării bacteriilor anaerobe (puroi, bilă recoltată intraoperator ş.a.)

Cantitatea de produs patologic prelevată pe tampon este foarte mică (maximum 0,1 ml), iar pe fibra tamponului elementele din probă se adsorb (atît bacteriile cît şi, în special, polimorfonuclearele) şi sînt recuperate numai parţial în frotiu sau în cultură. De aceea

- se va evita utilizarea tamponului ori de cîte ori avem posibilitatea recoltării probei în cantităţi mai mari (exsudate fluide, produse de chiuretaj ş.a.);
- se vor recolta mai multampoane dacă examenul presupune şi efectuarea de frotiuri sau însămînţări pe mai multe medii de cultură;
- frotiurile se vor etala imediat după recoltarea probei pe tampon.

Probele destinate izolării anaerobilor stricţi sînt introduse sub atmosferă de azot în flacoane ermetic închise. In lipsa acestora, o modalitate simplă şi eficientă de transport a unor asemenea probe este transportul

direct în seringa de recoltare după ce a fost îndepărtată orice bulă de aer iar acul obturat printr-un dop de cauciuc (fig.7-2).

7.4. Tehnici pentru recoltarea produselor patologice

7.4.1. Tehnicile pentru recoltarea probelor destinate examenului microbiologic vor fi expuse în detaliu la ficare capitol privind examenul microbiologic al principalelor produse patologice (⟶ 21-28.)

7.4.2. Tehnica recoltării sîngelui pentru examenul serologic

Material necesar:

- seringă de 10 ml cu ac pentru puncţii venoase, sterilizată la autoclav;
- eprubetă 16/160 mm sterilizată la autoclav;
- soluţie salină izotonă sterilă;
- garou, alcool de 70°, vată.

Recoltarea: se clăteşte cu soluţie salină izotonă seringa şi eprubeta. Se antiseptizează plica cotului prin badijonare insistentă în sens unic cu tampon de vată şi alcool, se aplică garoul, se punctionează vena. Se aspiră 5-10 ml sînge. Se dă drumul la garou, se retrage acul şi se comprimă bine locul punctiei cu tamponul îmbibat în alcool. Se introduce sîngele în eprubeta care se marchează cu indicativele pacientului.

Recoltele se fac cu seringă şi ac separate pentru fiecare pacient.

Separarea serului: sîngele este lăsat să coaguleze la temperatura camerei în eprubeta dispusă pe un plan înclinat. După coagulare eprubetele sînt menţinute o oră la 37°C pentru retractarea cheagului. După aceasta se desprinde cheagul de pe peretele eprubetei prin agitare sau cu ajutorul unei pipete Pasteur închisă la vîrf, iar eprubetele se menţin la 4°C pînă a doua zi cînd serul este decantat aseptic.

Pînă la efectuarea reacţiilor serul este păstrat la 4°C, iar dacă durata de conservare depăşeşte cîteva zile va fi menţinut congelat la -25°C. Dacă după decantare au rămas hematii, în vederea congelării serul se va redecanta.

Probele de ser destinate examenului serologic trebuie să fie sterile şi nehemolizate. Serurile hemolizate sau contaminate pot da rezultate false.

Scanned with OKEN Scanner

7.5. Transportul şi conservarea probelor

După eliminarea din organism, şansele de supravieţuire ale microbilor patogeni scad pe măsură ce se prelungeşte intervalul pînă la însămînţarea probelor pe medii de cultură adecvate.

Moartea microbilor infectanţi din probele destinate examenului microbiologic este o sursă de erori (rezultate fals negative). Poate fi cauzată de

- agenţi inhibitori de pe instrumentarul de recoltare, din soluţiile utilizate la decontaminarea tegumentului, mucoaselor, plăgilor, din soluţii anestezice şi de pe containerele utilizate;
- razele solare directe,
- deshidratare,
- modificări de pH,
- autoliză,
- antagonismul prin multiplicarea contaminanţilor normali ai unor produse patologice,
- oxigenul atmosferic în cazul anaerobilor stricţi.

De aceea, odată recoltate, probele trebuie transportate la laborator în cel mai scurt timp posibil.

Refrigerarea probelor este utilă cînd intervalul recoltare-examinare se prelungeşte. La 0°C (container plasat în gheaţă umedă) sau la 4°C (temperatura frigiderelor) majoritatea microbilor patogeni supravieţuesc o perioadă limitată (suficientă în general pentru efectuarea examenelor bacteriologice) iar multiplicarea contaminanţilor normali este oprită.

Puţine bacterii nu rezistă la refrigerare: meningococul, gonococul, Haemophilus influenzae. Meningococul şi gonococul mor chiar la temperatura camerei, de aceea produsele patologice în care se presupune prezenţa acestor bacterii (l.c.r., sînge, exsudate articulare, puroi uretral ş.a.) trebuie însămînţate direct la patul bolnavului în medii preîncălzite la 37°C. sau transportul probelor făcut foarte repede la 37°C.

Mediile de transport asigură o bună supravieţuire microbilor patogeni prin menţinerea unui pH favorabil, prevenirea desicării, a oxidării şi a autolizei enzimatice. Virusurile fiind deosebit de sensibile la variaţiile de pH, mediile pentru transportul probelor destinate examenului virologic sînt tamponate şi conţin roşu fenol pentru controlul pH-ului, ceea ce imprimă acestor medii

în mod caracteristic culoarea roz.

7.6. Aspecte particulare privind recoltarea, transportul, prelucrarea şi conservarea probelor pentru examenul virologic

La recoltarea, transportul, prelucrarea şi conservarea probelor pentru diagnosticul virologic se va ţine cont de următoarele:

- specificul cultivării virusurilor impune (—>4.)
  - inocularea unor probe lichide (suspensionarea probelor),
  - debarasarea completă a suspensiei virale de bacterii, fungi şi, pe cît posibil, de debriuri celulare (adiţie de antibiotice la mediul de transport şi centrifugarea probelor);
- porţiuni din fiecare probă vor fi conservate pentru necesitatea reizolării virusului (— 6.4.2.);
- semiviaţa majorităţii virusurilor (perioada de timp în care infecţiozitatea suspensiilor virale se reduce cu 5o%) se măsoară în ore la temperatura camerei, în zile la 4°C şi în luni la -70°C.

De aceea

(1) Probele de produse patologice, imediat după recoltare, se introduc într-un flacon cu 2-5 ml mediu conservant, obişnuit mediu Hanks cu o,25-o,5% serumalbumină bovină, pentru conservarea infecţiozităţii virusului, looo unităţi penicilină, 5oo µg streptomicină şi 5o unităţi nistatină/ml.

Cînd în acelaşi produs patologic se urmăreşte prezenţa virusurilor, bacteriilor, rickettsiilor, chlamydiilor sau mycoplasmelor probele vor fi suspensionate în mediu conservant fără antibiotice; pentru izolarea virusurilor, antibioticele urmînd a fi adăugate la prelucrarea probelor în laborator.

Fragmentele de organ recoltate la necropsie sau prin puncţie biopsie se introduc în glicerină soluţie 5o% tamponată, urmînd a fi spălate în mediu conservant înainte de inoculare.

(2) Dacă transportul la laborator durează mai mult de cîteva ore, probele se refrigerează la 0-4°C.

(3) La primirea în laborator probele sînt

- suspensionate în mediu conservant; suspensionarea se face, în funcţie de natura probelor, prin agitare cu perle de sticlă (tampon, spută, materii fecale), mojarare cu pulbere de cuarţ sterilă (ţesuturi);
- centrifugate 15 minute la 2ooo rpm (suspensiile de materii

Scanned with OKEN Scanner

fecale 2o minute la lo.ooo rpm la 4°C);

- inoculate.

Probele care prin natura lor nu se pretează suspensionării în mediu conservant (de exemplu, l.c.r.) vor fi inoculate imediat, iar dacă aceasta nu este posibil vor fi congelate.

(4) Porţiunile de probă păstrate pentru referinţă ulterioară (reizolarea virusului), după prelucrarea în vederea inoculării

- se congelează brusc, în strat subţire (eprubetă sau fiolă rotită în poziţie înclinată în amestec de zăpadă carbonică şi alcool);
- se depozitează la conservatorul de -25°;
- în vederea reinoculării, se decongelează rapid sub curent de apă.

Dacă laboratorul nu dispune de posibilitatea izolării şi identificării virusurilor, probele pregătite conform punctului (3) sînt fiolate, congelate la -70°C şi expediate către laboratorul competent în termos cu amestec de gheaţă carbonică şi alcool (Dacă probele nu sînt fiolate, CO_2 din termos trece prin dop, acidifică proba şi compromite viabilitatea virusului).

Pentru recoltarea produselor patologice trebuie să avem în vedere relaţia dintre stadiile de evoluţie a infecţiei virale şi prezenţa virusului în produsele patologice ca şi apariţia anticorpilor specifici (tabelul 7-1).

Tabelul 7-1

Relaţia între stadiile de evoluţie a infecţiei virale, prezenţa virusului în produsele patologice şi apariţia anticorpilor specifici (după Jawetz, Melnick, Adelberg, 198o)

Stadiul bolii	Virusul în produse patologice	Anticorpi specifici
Incubare	rar	nu
Prodromal	ocazional	nu
Debut	frecvent	ocazional
Faza acută	frecvent	frecvent
Insănătoşire	rar	obişnuit
Convalescenţă	foarte rar	obişnuit

Natura produselor patologice care servesc la izolarea virusurilor este specificată în tabelul 7-2.

Tabelul 7-2

Produsele patologice recoltate pentru izolarea virusurilor (după Jawetz, Melnick şi Adelberg, 1980)

Manifestarea clinică, agenţi cauzali virali	Natura probelor pentru izolarea virusului	
	Cazuri clinice	Post-mortem sau biopsie
Infecţii ale tractusului respirator superior		
Rhinovirusuri, Virusuri paragripale, Virus respirator sinciţial	exsudat faringian secreţii nasale	-
Adenovirusuri, Enterovirusuri, Reovirusuri	exsudat faringian fecale	-
Infecţii ale tractusului respirator inferior		
Virusuri gripale, Adenovirusuri, Virusuri paragripale, Virus respirator sinciţial	exsudat faringian spută	pulmon
Pleurodinie		
Virusuri Coxsackie	exsudat faringian fecale	-
Viroze cutanate şi ale mucoaselor		
Veziculare:		
- vaccină, - herpes, - varicelă-zoster	lichid vezicular	ficat, splină, pulmon
Cu exantem:		
- rujeolă,	exsudat faringian	
- rubeolă	sînge	
Enterovirusuri	exsudat faringian fecale	
Diaree la copii		
Rotavirus	fecale	fragmente de intestin
Infecţii ale sistemului nervos central (SNC)		
Enterovirusuri	fecale, l.c.r.	
Virusul herpetic	exsudat faringian l.c.r.	
Virusul parotiditei epidemice	exsudat faringian l.c.r., urină	fragmente de creier
Virusul coriomeningitei limfocitare	sînge, l.c.r.	
Arbovirusuri	sînge, l.c.r.	
- turbare	salivă	creier şi glandă submaxilară

(continuare pe pagina următoare)

Tabelul 7-2
(continuare)

Manifestarea clinică, agenţi cauzali virali	Natura probelor pentru izolarea virusului	
	Cazuri clinice	Post-mortem sau biopsie
Infecţii cronice ale SNC		
Virusul rujeolic: panencefalită sclerozantă subacută		fragmente de creier
Papovavirus uman: encefalopatie progresivă multifocală		
Parotidită		
Virusul parotiditei epidemice	exsudat faringian	-
Virusul citomegalic	salivă şi urină	
Boli febrile nediferenţiate		
- febra galbenă	sînge	ficat, splină
- denga		
Anomalii congenitale		
Virusul citomegalic	urină, exsudat faringian	rinichi, pulmon ş.a.
Virusul rubeolei	exsudat faringian l.c.r.	ganglioni limfatici, pulmon splină ş.a.

BIBLIOGRAFIE

Bailey W.R., Scott E.G. (1974): Diagnostic Microbiology, ed.IV-a, C.W.Mosby Company, Saint Louis, pp.25-32.

Fenner J.F., White D.O. (1976): Medical Virology, ed.II-a, Academic Press, New York, pp.255-284.

Jawetz E., Melnick J.C., Adelberg E.A. (1980): Review of Medical Microbiology, ed.XIV-a, Lange Med.Publ., Los Altos, California.

W.H.O. (1978): Guiding principles and recommendations on labelling of clinical laboratory materials: a WHO memorandum. Bull.Wld Hlth Org., 56:881.

Scanned with OKEN Scanner

MODEL PENTRU UN BULETIN DE ANALIZA MICROBIOLOGICA SAU SEROLOGICA

Spitalul_____
Clinica/Secţia_____

Numele_____ Prenumele_____ Vîrsta_____
Diagnosticul prezumtiv_____
Data îmbolnăvirii_____
Proba de cercetat_____
Examenul solicitat (în termeni precişi)_____
_____
Vaccinări în antecedente_____
Antibioterapie înaintea recoltării probei (drogul, calea de administrare, doza şi ora ultimei administrări)_____
_____
Data recoltării_____ ora_____ de către_____
Expediat în ziua de_____ ora_____ prin_____
Conservat: la_____ de la ora_____ la ora_____

Semnătura medicului solicitant

Primit în laborator în ziua de_____ ora_____
Condiţiile în care a ajuns în laborator_____
Rezultatul analizei_____
_____
_____
_____
Antibiograma_____
_____

Semnătura medicului
şef de laborator

NOTA: PRODUSELE NECORESPUNZATOR RECOLTATE SI EXPEDIATE SINT REFUZATE DE CATRE LABORATORUL DE MICROBIOLOGIE SI SEROLOGIE !

Scanned with OKEN Scanner

8. METODE DE LABORATOR IN CONDUCEREA ANTIBIOTERAPIEI

DUMITRU T. BUIUC

8.1. Determinarea sensibilităţii bacteriilor la antibiotice: antibiograma

8.1.1. Aspecte generale şi definiţii

Sensibilitatea unei bacterii se testează *in vitro* punînd-o în condiţii optime şi standard de cultivare (mediu de cultură, inoculum, timp de incubare ş.a.) în prezenţa unor cantităţi descrescînde de antibiotic.

> Cea mai mică cantitate de antibiotic care inhibă dezvoltarea bacteriei testate se numeşte concentraţie minimă inhibitorie (CMI). CMI caracterizează relaţia microb-antibiotic *in vitro*

In organismul bolnav în relaţia microb-antibiotic intervine al treilea factor: concentraţiile de antibiotic activ realizate în focarul infecţios. Acestea sînt foarte diferite şi depind de

- localizarea infecţiei,
- difuzia antibioticului în focarul infecţios,
- inactivarea suferită de antibiotic în organism.

Pentru necesităţile terapeutice curente definim o bacterie în raport cu un antibiotic

- sensibilă: dacă CMI este de minimum 2-4 ori mai mică decît nivelul seric mediu al antibioticului; un efect terapeutic este posibil cu doze uzuale ale acestui antibiotic;
- rezistentă: dacă CMI este mai mare decît nivelul seric mediu; efect terapeutic nu se poate obţine; acest antibiotic îşi manifestă efectele toxice înainte de a putea atinge CMI;
- moderat rezistentă: dacă CMI este apropiată de nivelul seric mediu; efect terapeutic se poate obţine numai cu doze mari ale acestu antibiotic sau prin administrarea sa locală.

Se înţelege că pentru localizări particulare ale infecţiei,

Scanned with OKEN Scanner

cum sînt cele meningiene, la nivelul căilor urinare, respiratorii inferioare, biliare ş.a., CMI a microbului izolat se va raporta la concentraţia antibioticului activ respectiv în l.c.r., urină, secreţii bronşice, bilă.

Testările le facem pentru un set de antibiotice selectat în funcţie de

- bacteria izolată şi
- localizarea focarului de infecţie (tabelul 8-1).

Tabelul 8-1

Criterii de alegere a antibioticelor pentru antibiogramă

	Stafilococi	Streptococi piogeni	Pneumococi	Streptococi grup D	Meningococi	H.influenzae	Enterobacterii	Bacilul piocianic
Ampicilină				X	X	X	X	
Carbenicilină							[X]	X
Cefalotin	X		[X]	X	X	X	X	
Cloramfenicol	[X]				[X]	[X]	[X]	[X]
Colimicină							(X)	(X)
Eritromicină	X	[X]		X				
Gentamicină	[X]						X	X
Kanamicină							X	
Lincomicină	[X]							
Nalidixic acid							(X)	
Nitrofurantoin				(X)			(X)	
Novobiocină	[X]							
Oxacilină[1)]	X							
Penicilină G	X	[X]	[X]	X	X			
Pristinamicină	[X]							
Rifampicină	[X]							
Streptomicină				[X]			[X]	[X]
Tetraciclină	[X]	[X]	[X]		[X]		[X]	[X]
Trimetoprim/ Sulfametoxazol							(X)	

1) Determinare echivalentă şi pentru meticilină.

Legenda: X = recomandat pentru specia indicată; [ ] = recomandat numai pentru izolaţii din hemoculturi; ( ) = recomandat pentru izolaţii din infecţii ale căilor urinare.

După modalitatea de realizare a gradientului de concentraţii ale antibioticelor faţă de care testăm o bacterie deosebim: (1) metoda diluţiilor şi (2) metoda difuzimetrică.

Ca martori pentru controlul testării folosim tulpini de colecţie, care îşi păstrează nealterată sensibilitatea naturală la

antibiotice: Staphylococcus aureus (NCTC 6571 sau ATCC 25923) cînd testăm bacterii gram-pozitive şi Escherichia coli (NCTC 10418 sau ATCC 25922) cînd testăm bacterii gram-negative.

8.1.2. Metoda diluţiilor

8.1.2.1. Determinarea concentraţiei minime inhibitorii (CMI)

Indicaţii:

- metoda de elecţie pentru testarea tulpinilor izolate din infecţii grave care ameninţă viaţa bolnavilor (septicemii, endocardite subacute, meningite);
- testări pentru bacterii cu cultivare lentă şi pretenţioase nutritiv, bacterii anaerobe;
- testarea preliminară determinării concentraţiei minime bactericide.

Tabelul 8-2

Gama minimă de diluţii suficientă pentru necesităţile clinice în testarea sensibilităţii bacteriilor la antibiotice (după Washington II; Bailey şi Scott)

Antibioticul	Concentraţii (µg/ml)									
	0,1	0,78	1,56	3,12	6,25	12,5	25	50	100	200
Ampicilină			X	X	X	X			(X)	
Carbenicilină								X	X	X
Cefalotin				X	X	X			(X)	
Cloramfenicol				X	X	X				
Eritromicină	X	X		X						
Gentamicină		X	X	X						
Kanamicină					X	X				
Meticilină		X		X						
Nalidixic acid						(X)				
Nitrofurantoin							(X)			
Penicilină G	X									
Tetraciclină		X		X						

Legenda: X = diluţia recomandată; ( ) = recomandat numai pentru izolaţii din infecţii ale căilor urinare

Necesităţile clinice sînt satisfăcute prin testarea faţă de 3-4 diluţii care acopăr gama de concentraţii serice sau, după caz, urinare realizate prin posologia uzuală a diferitelor antibiotice (tabelul 8-2). Tulpinile martor se testează faţă de CMI cunoscută ± o diluţie (fig.8-1). In tabelul 8-3 este prezentată cheia pentru interpretarea CMI în raport cu criteriile stabilite pentru definirea sensibilităţii şi rezistenţei.

Scanned with OKEN Scanner

Diluţiile se pot efectua în bulion Mueller-Hinton repartizat în tuburi (fig.8-1) sau în agar Mueller-Hinton repartizat în plăci Petri.

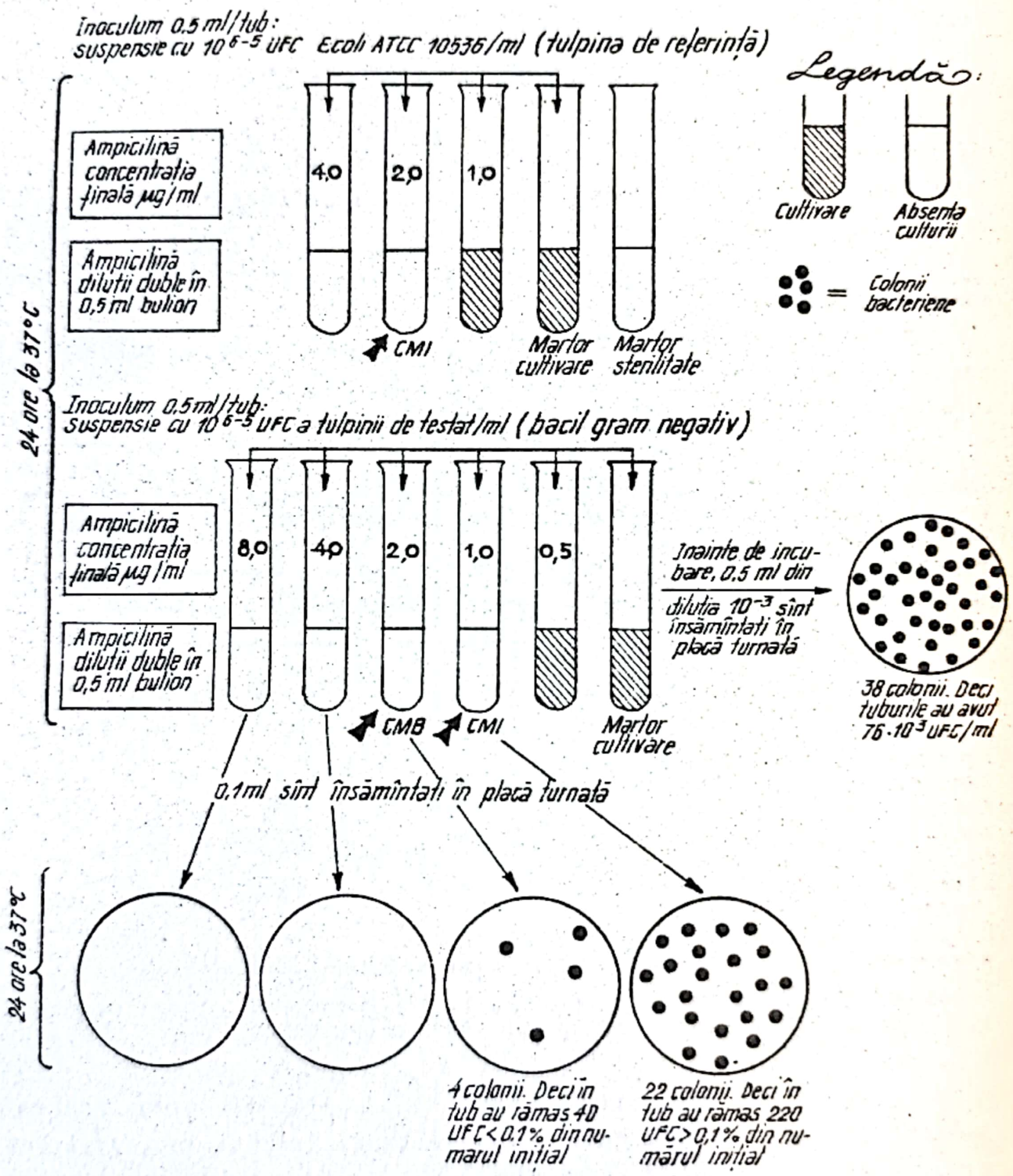


Fig.8-1 Reprezentare schematică a determinării concentraţiei minime inhibitorii (CMI) şi concentraţiei minime bactericide (CMB) prin metoda diluţiilor în tuburi

Tabelul 8-3

Cheia pentru interpretarea CMI

Antibioticul	Concentraţia serică medie µg/ml	CMI µg/ml	
		Rezistent	Sensibil
Ampicilină bacili gram-negativi şi enterococi	5o- 2	>12,5	≤6,25
Carbenicilină bacil piocianic	3oo-loo	≥2oo	≤loo
Cefalotin	15- o,2	>12,5	≤6,25
Cloramfenicol	lo- 4	>12,5	≤12,5
Eritromicină	3,5-1,5	>3,12	≤o,78
Gentamicină	4- 2,5	>3,12	≤1,56
Kanamicină	2o- 1	>12,5	≤6,25
Meticilină	12- o,15	>3,12	≤1,56
Nalidixic acid		>12,5	≤12,5
Nitrofurantoin	3	>25	≤25
Penicilină G stafilococi	lo- 1	>o,1	≤o,1
Streptomicină	4o- 5	>25	≤12,5
Tetraciclină	4- 1	>3,12	≤1,56

8.1.2.2. Determinarea concentraţiei minime bactericide (CMB)

Indicaţii:

- testarea izolaţilor din infecţii grave ale pacienţilor cu apărarea antiinfecţioasă compromisă (de exemplu, septicemii),
- testarea izolaţilor din infecţii care evoluează în zone unde factorii umorali şi celulari antiinfecţioşi au acces limitat (de exemplu, endocardite subacute).

Dacă se efectuează numărătoarea bacteriilor viabile din tuburile fără cultură evidentă în determinarea CMI, poate fi determinată concentraţia minimă bactericidă (CMB), definită ca cea mai mică concentraţie de antibiotic care distruge în proporţie de 99,9-loo% bacteriile din inoculum (fig.8-1).

8.1.2.3. Antibiograma pentru bacilii tuberculozei, bacterii cu creştere foarte lentă, foloseşte o variantă a metodei diluţiilor. Experienţa a arătat că infecţia tuberculoasă este refractară la terapia cu un tuberculostatic atunci cînd populaţia infectantă are >1% din indivizi rezistenţi i n v i t r o la acel tuberculostatic. Practic, se testează un inoculum ajustat la un număr de unităţi formatoare de colonii posibil de numărat astfel încît procentajul supravieţuitorilor în prezenţa unor concentraţii de

8.1.

tuberculostatice realizabile în focarele posibile ale infecţiei tuberculoase (pulmonare ş.a.) să poată fi apreciat.

8.1.3. In metoda difuzimetrică gradientul de concentraţii necesar determinării se realizează în mediu solid prin difuzarea radială a antibioticului dintr-un depozit (microcomprimat sau rondelă de hîrtie de filtru) depus pe suprafaţa mediului într-o placă Petri după însămînţarea bacteriei de testat. Acest gradient scade proporţional cu patratul distanţei de la depozit. Cultura nu apare în aria în care antibioticul realizează $\geqslant$ CMI pentru bacteria testată. Cu cît CMI este mai redusă cu atît aria de inhibiţie apare mai mare şi invers (fig.8-2). Pentru a recunoaşte antibioticele, microcomprimatele sau rondelele poartă iniţiala antibioticului conţinut. Cantitatea de antibiotic conţinută de rondele sau microcomprimate are ordinul de mărime al concentraţiilor posibil de obţinut în ser în condiţii terapeutice.

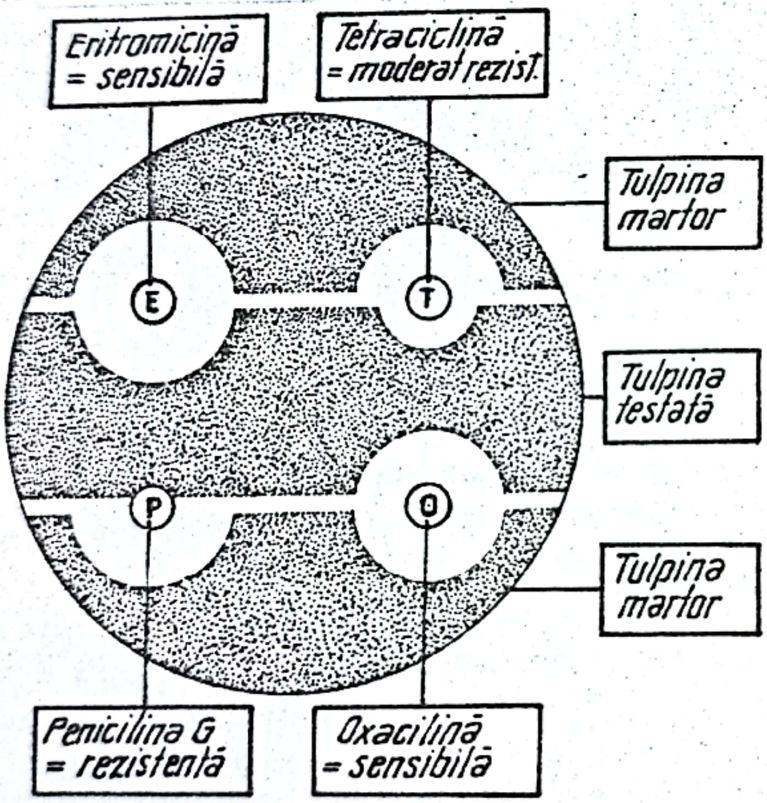


Fig.8-2 Aspectul antibiogramei difuzimetrice prin metoda comparativă Stokes

Indicaţii:

numai pentru bacteriile cu creştere rapidă. Metoda nu poate fi aplicată la testarea bacteriilor cu creştere lentă cum sînt bacilii tuberculozei sau unele bacterii anaerobe nesporulate. Permite testarea mai multor antibiotice pe aceeaşi placă dar gradul de corelaţie cu CMI reală este de numai 70-90%, cea mai redusă corelaţie fiind observată cu antibioticele aminoglicozidice. De aceea, în infecţii care ameninţă viaţa bolnavului sau în lipsa răspunsului terapeutic, pentru antibioticele selectate prin metoda difuzimetrică se testează precis CMI prin metoda diluţiilor.

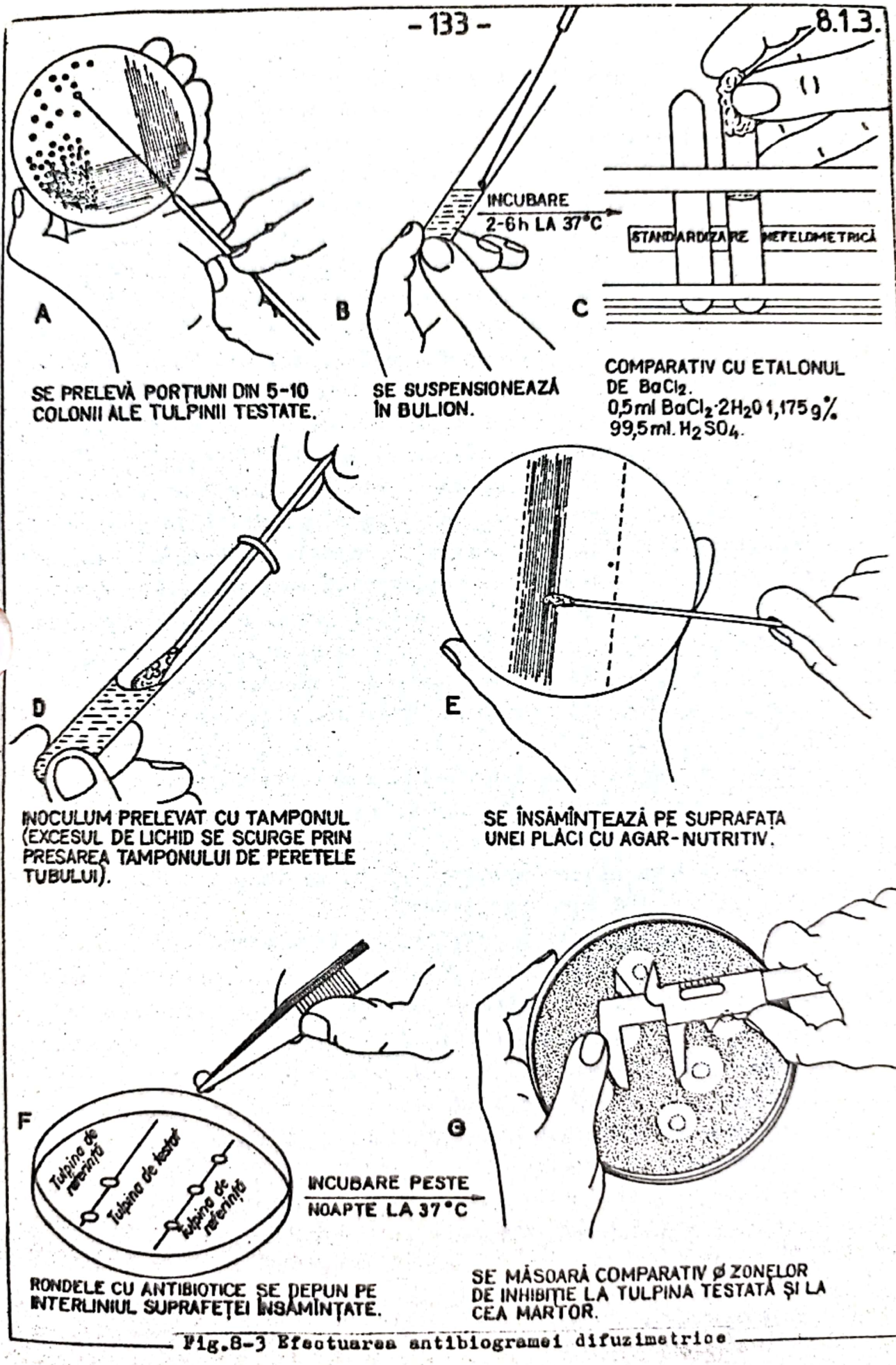


Fig.8-3 Efectuarea antibiogramei difuzimetrice

8.1.

Prezentăm metoda difuzimetrică în varianta tehnică recomandată de Comitetul de bacteriologie al Asociaţiei de patologie clinică din Marea Britanie.

Intr-o placă Petri cu Ø de 10 cm şi cu fundul perfect plan se toarnă un strat uniform de 3 mm grosime de agar Mueller-Hinton (suplimentat cu sînge pentru bacteriile pretenţioase nutritiv).

Cu ajutorul unui tampon se însămînţează uniform bacteria testată în 1/3 mijlocie a plăcii. Tulpina martor este însămînţată în mod similar în 1/3 superioară şi inferioară (fig.8-3). Inoculum trebuie să asigure o cultură confluentă şi trebuie să aibă aceeaşi densitate de la o determinare la alta. Poate fi reprezentat de cultură în faza logaritmică (4-6 ore) a bacteriei testate izolată în prealabil în cultură pură, de unde numele de antibiogramă pe subcultură (ASC). In ASC inoculum se standardizează nefelometric (fig.8-3). In cazul produselor patologice monomicrobiene (lcr ş.a.) cu o densitate suficientă a bacteriei infectante (apreciată microscopic), pentru antibiograma difuzimetrică se poate folosi ca inoculum însuşi produsul patologic - antibiograma se face concomitent cu izolarea bacteriei infectante, de unde şi numele de antibiogramă pe cultură primară (ACP). In cazul ACP standardizarea microscopică a inoculului este aproximativă, dar suficientă pentru necesităţile clinice.

Microcomprimatele sau rondelele cu antibiotic sînt depuse pe interliniile care separă suprafeţele însămînţate cu tulpina testată şi cu cea martor (fig.8-3).

După depunerea microcomprimatelor cu antibiotice, plăcile sînt incubate la 37°C timp de 18 ore.

Citirea şi raportarea rezultatelor. Se măsoară în mm raza zonei de inhibiţie a culturii tulpinii testate comparativ cu cea a tulpinii martor (fig.8-3). Diferenţele de ±2 mm nu sînt semnificative. Densitatea culturii şi viteza de creştere a celor 2 tulpini fiind echivalente şi tulpina de referinţă sensibilă la antibioticele utilizate, se poate conchide despre tulpina testată că este

- sensibilă, dacă raza ariei de inhibiţie este egală sau mai mare decît a tulpinii martor;
- rezistentă, dacă zona de inhibiţie lipseşte;
- moderat rezistentă, dacă raza ariei de inhibiţie este mai mică decît a tulpinii martor.

Aşadar, în acest caz nu se poate raporta o valoare definită a CMI pentru tulpina testată ci se apreciază dacă aceasta este sau

nu este de acelaşi ordin de mărime cu cea a tulpinii martor, care este sensibilă la antibioticul respectiv.

8.1.4. Testarea efectului antimicrobian al antibioticelor în asociaţie

Indicaţiile se limitează la:

- infecţii cu tulpini rezistente la antibioticele disponibile
- infecţii mixte determinate de bacterii cu spectre de sensibilitate diferite;
- riscul de intoxicaţie prin administrarea prelungită a unui antibiotic toxic.

Testarea pe suprafaţa mediului solid este suficient de fidelă şi cea mai accesibilă laboratorului clinic.

8.1.4.1. Determinarea efectului inhibitor al asociaţiei. Pe suprafaţa unei plăci însămînţate cu tulpina de testat se depun în

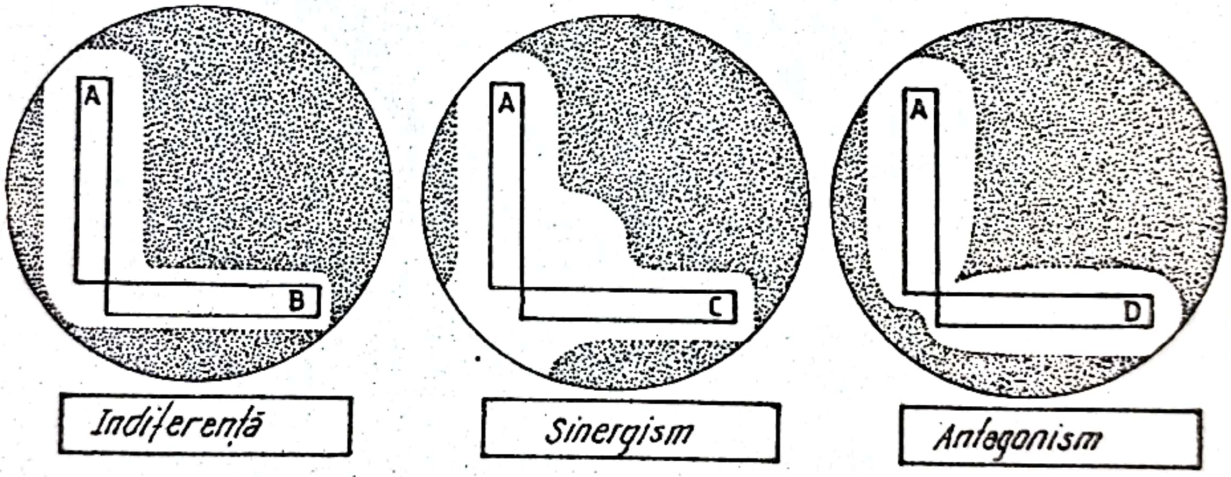


Fig.8-4 Testarea efectului inhibitor al antibioticelor în asociaţie

unghi drept 2 benzi de hîrtie de filtru impregnate fiecare cu cîte un antibiotic diferit (în cantităţi de ordinul celor realizabile în ser). Din configuraţia zonei de inhibiţie în unghiul dintre cele 2 benzi se trag concluzii privind efectul bacteriostatic al asociaţiei: sinergic, antagonic, indiferent (fig.8-4).

8.1.4.2. Determinarea efectului bactericid al asociaţiei prin metoda transferului cu tambur de celofan. Pe suprafaţa unui mediu în care au predifuzat antibioticele din 2 benzi de hîrtie de filtru depuse în unghi drept se aplică un tambur cu membrană de celo-

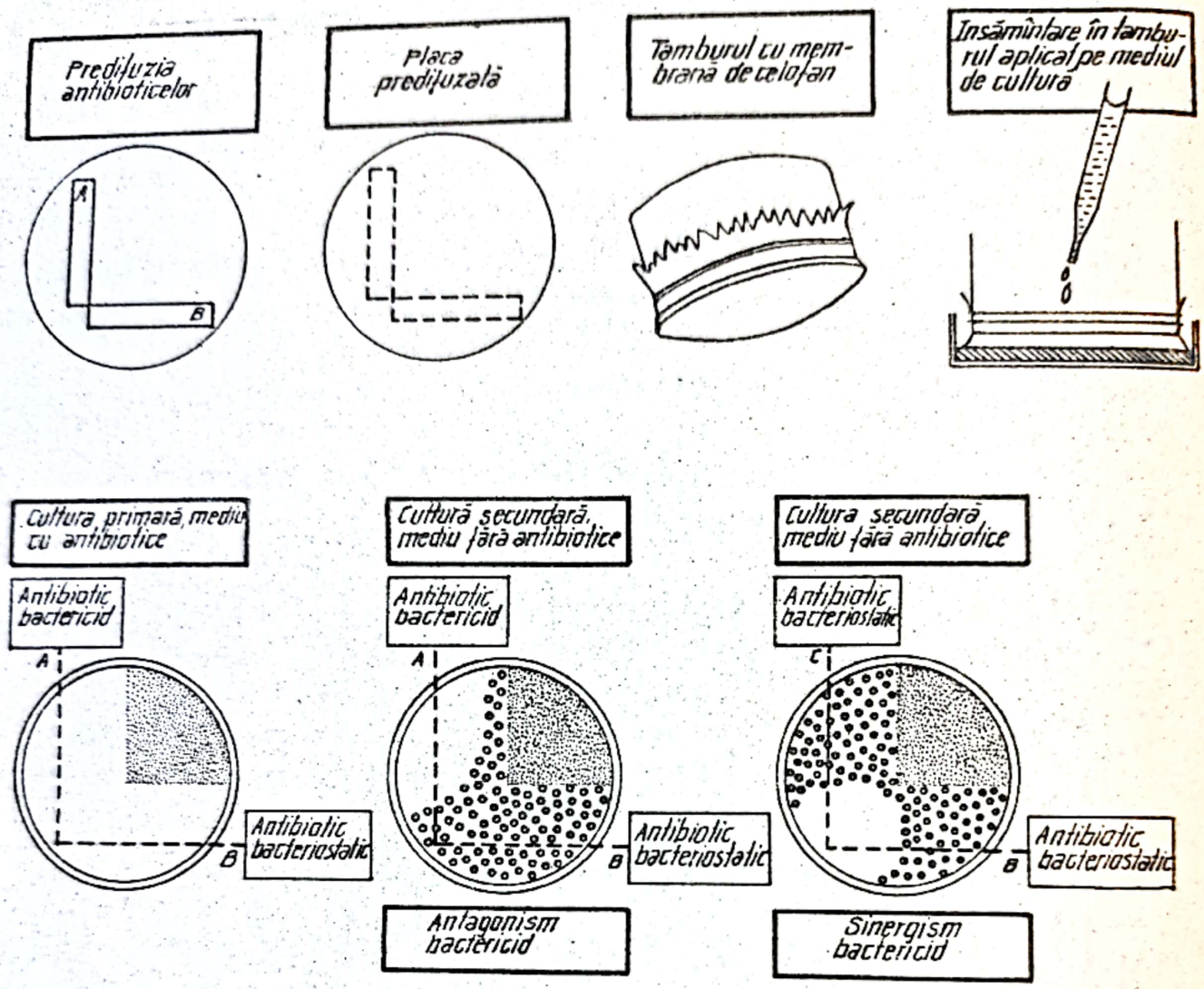


Fig.8-5 Testarea efectului bactericid al antibioticelor în asociaţie prin metoda transferului cu tambur de celofan

fan a cărei suprafaţă internă se însămînţează cu tulpina de testat (fig.8-5 sus). Se incubează peste noapte la 37°C. Graţie difuziunii prin celofan a substanţelor nutritive şi a antibioticelor din mediul subjacent, pe suprafaţa internă a membranei se obţine o primă cultură care reflectă efectul bacteriostatic al celor 2 antibiotice. Tamburul cu membrana de celofan se transferă pe suprafaţa unui nou mediu fără antibiotice. Se incubează. Se obţine o a doua cultură care reflectă efectul bactericid al asociaţiei de antibiotice (fig.8-5 jos).

8.2. Cercetarea antibioticelor în umori în cursul antibioterapiei

8.2.1. Determinarea nivelului de eficienţă inhibitorie (NEI) sau bactericidă (NEB) a serului (şi altor umori) este cea mai simplă metodă pentru monitorizarea antibioterapiei.

Principiu. Se determină cea mai mare diluţie de ser (l.c.r. ş.a.) care inhibă (NEI) sau omoară $\geqslant$ 99,9% din unităţile formatoare de colonii (NEB) ale unui inoculum preparat din tulpina infectantă recent izolată de la bolnav.

Indicaţii: monitorizarea antibioterapiei la pacienţi cu

- endocardite subacute (focar infecţios insuficient penetrat de factorii apărării antiinfecţioase);
- septicemii (deficienţe antiinfecţioase sistemice);
- meningite bacteriene (focar infecţios în care difuziunea antibioticului este variabilă).

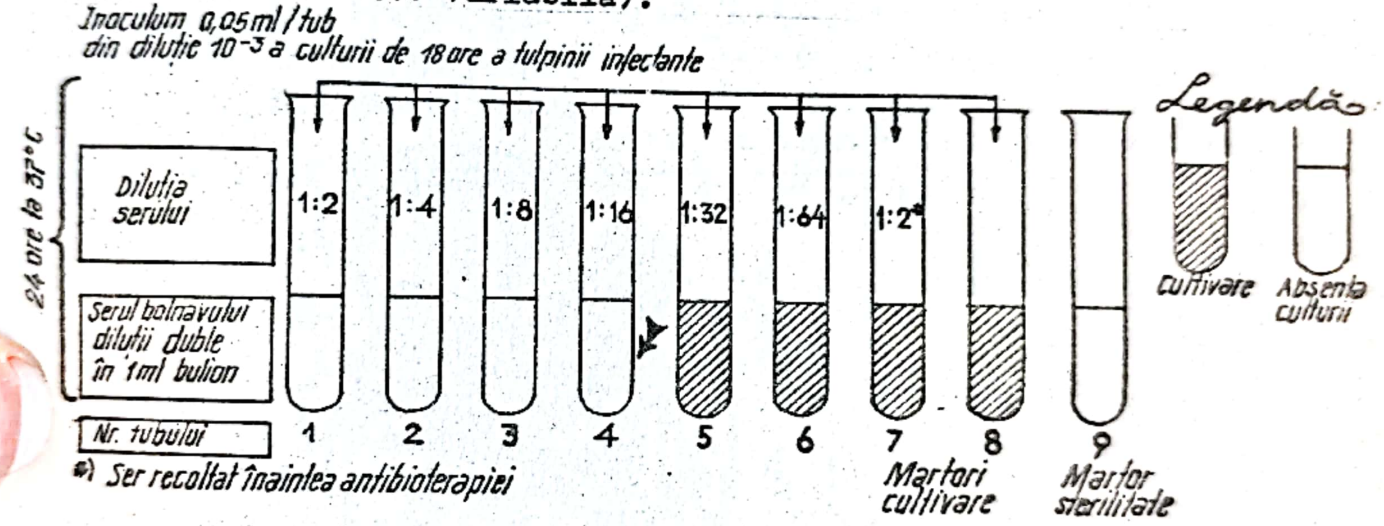


Fig.8-6 Determinarea NEI seric. Reprezentare schematică. In această probă de ser NEI realizat de antibioticul administrat este de 1:16 (indicat de săgeată)

Recoltarea probelor (sînge, l.c.r. ş.a.) se face aseptic. O primă probă, martorul, se recoltează înaintea antibioterapiei. După 24 ore de antibioterapie, interval în care aportul şi excreţia de antibiotic se echilibrează, se recoltează următoarele probe

- imediat înaintea administrării unei noi doze (NEI sau NEB minim), dacă administrarea antibioticului este intermitentă;
- la un moment oarecare, dacă antibioticul se administrează în perfuzie.

Cantităţile necesare: lo ml sînge, 1-2 ml l.c.r.

8.2.

Probele se expediază imediat la laborator unde serul este separat de cheag şi se procedează la testare.

Testarea NEI este prezentată schematic în fig.8-6.

Interpretarea rezultatelor. Se consideră că un NEI seric ≥1:8 reflectă eficienţa antibioterapiei.

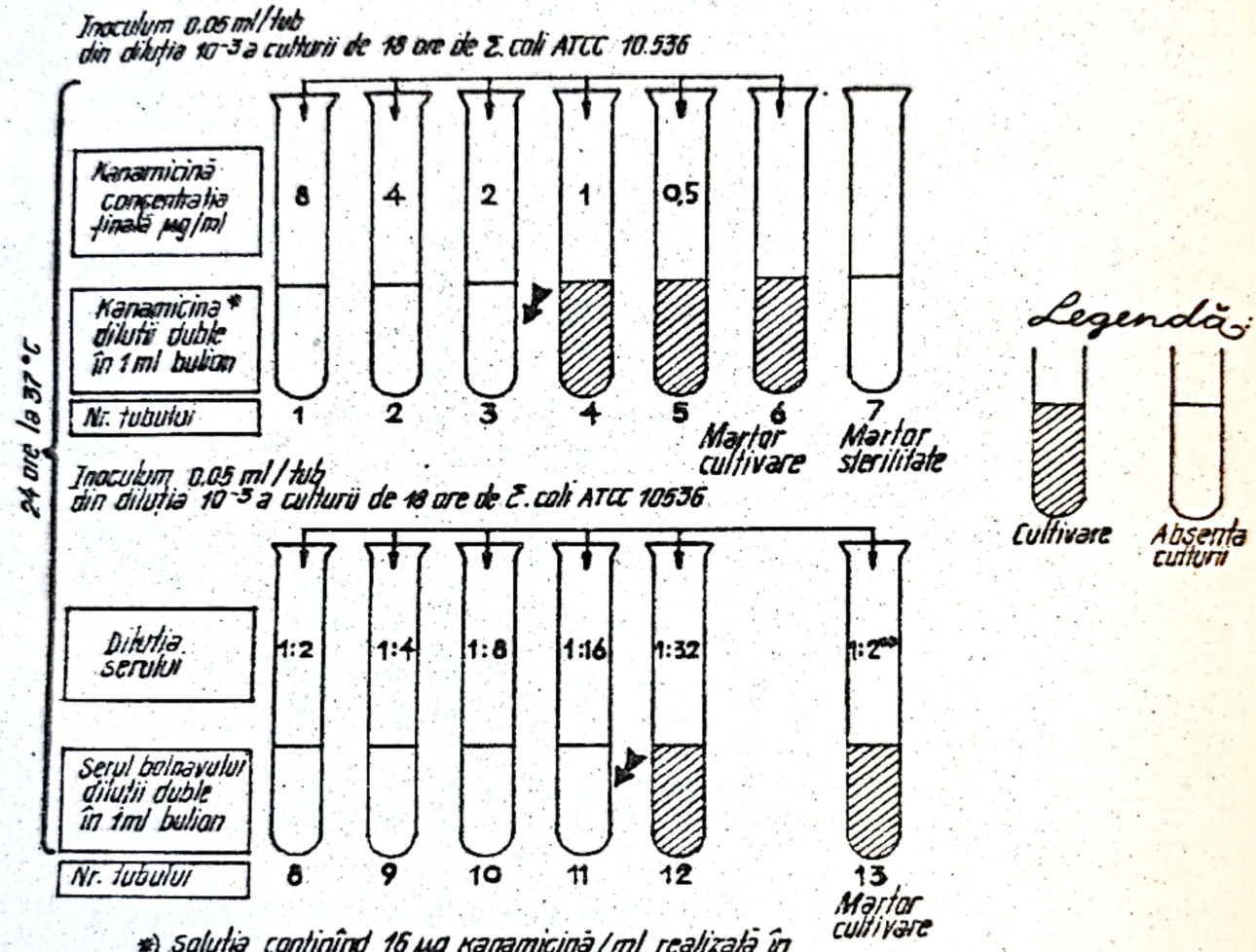


Fig.8-7 Testarea concentraţiei de kanamicină în ser. Reprezentare schematică. CMI a kanamicinei pentru tulpina de referinţă E.coli ATCC 10536 = 2 µg/ml. Cea mai mică diluţie de ser care inhibă tulpina de referinţă = 1:16, deci în diluţia 1:16 a serului s-a realizat CMI a kanamicinei pentru tulpina de referinţă. Aşadar în serul testat kanamicina a realizat o concentraţie de 16x2 = 32 µg/ml

8.2.2. Dozarea antibioticelor în umori

Indicaţii:

- cînd se administrează antibiotice potenţial toxice;

● în antibioterapia pacienţilor cu deficienţe metabolice şi excretorii (hepatice, renale);

● cînd se administrează un antibiotic nou sau pe o cale nouă;

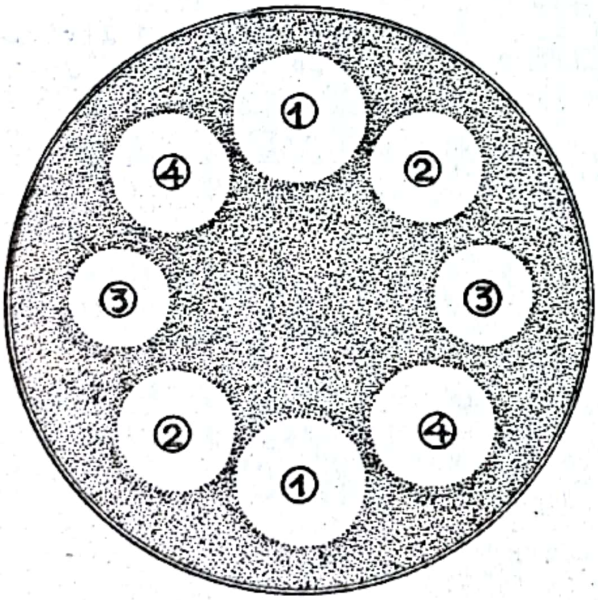
● cînd difuziunea antibioticului într-un focar infecţios este variabilă (l.c.r., exsudat bronho-alveolar ş.a.).

Principiu. Se determină concomitent, în condiţii identice, răspunsul unei tulpini de referinţă foarte sensibilă

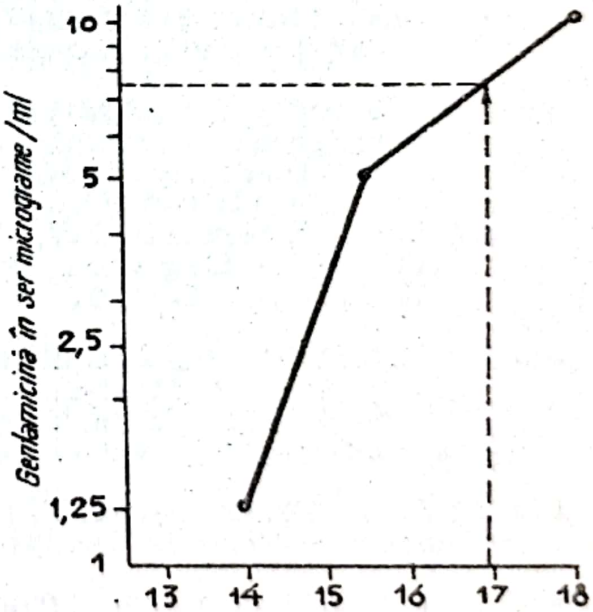
● la concentraţii cunoscute ale antibioticului administrat,

● la concentraţia necunoscută realizată de acest antibiotic în ser, respectiv în l.c.r. ş.a.

Recoltarea probelor se face aseptic. O primă probă se recoltează înaintea antibioterapiei*). Următoarele probe se recoltează după 24 ore de antibioterapie în momentul concentraţiei maxime (1-2 ore după administrarea orală, 3o minute după cea intramusculară şi 5-1o minute după cea intravenoasă a antibioticului) şi minime (imediat înaintea administrării unei noi doze) a antibioticului. Probele se expediază imediat la laborator.



Fiecare rondelă impregnată extemporaneu cu
1 = 0,02 ml sol. 10 µg gentamicină/ml în ser normal
2 = 0,02 ml sol. 5 µg gentamicină/ml în ser normal
3 = 0,02 ml sol. 1,25 µg gentamicină/ml în ser normal
4 = 0,02 ml ser de cercetat



Diametrul zonei de inhibiţie în mm
Fiecare punct al curbei reprezintă media a 2 determinări pe placa alăturată.

Fig.8-8 Determinarea concentraţiei de gentamicină în ser prin metoda difuzimetrică. Săgeata indică pe grafic concentraţia de gentamicină realizată în proba de ser.

Testarea prin metoda diluţiei duble în tuburi, care realizează un gradient discontinuu de concentraţii ale antibioticului cu limite ale erorii de ± 1 $\log_2$ (fig.8-7), este prea puţin convenabilă dozării antibioticelor pentru care diferenţa între concentraţia terapeutică şi cea toxică este mică. De exemplu, gentamicina pentru care concentraţia terapeutică este de 4 µg/ml iar cea toxică de 12 µg/ml. In aceste cazuri recurgem la metoda difuzimetrică (fig.8-8). Aceasta prezintă o sumă de avantaje:

- pe placa însămînţată în prealabil cu tulpina de referinţă (prin încorporarea acesteia în geloză-nutritivă) se realizează un gradient continuu de concentraţii ale antibioticului;
- este mai rapidă;
- permite dozări şi în umori contaminate.

BIBLIOGRAFIE

Balş M. (1976): Terapia infecţiei, ed.II-a, Editura medicală, Bucureşti, pp.294-342.

Dickert H., Machka K., Braveny I. (1981): The uses and limitations of disc diffusion in the antibiotic sensitivity testing of bacteria. Infection, 9:18.

Duca E., Buiuc D. (1977): Antibiogramă pe cultură primară sau/şi antibiogramă pe subculturi. Antibiograma privită de microbiolog, inoculum reprezentativ. Viaţa medicală, 24:535.

Garrod L.P., Waterworth P.M. (1971): A study of antibiotic sensitivity testing with proposals for simple uniform methods. J.Clin.Path., 24:779.

O.M.S. (1977): Comité OMS d'experts de la standardisation biologique. Vingt huitième rapport. Annexe 5: Normes relatives aux épreuves de sensibilité aux antibiotiques. Série de rapports techniques no.610, Genève, pp.1o6-138.

Stokes E.J. (1968): Clinical Bacteriology, ed.III-a, E.Arnold, London, cp.7.

Washington II J.A. (1979): The clinician and the microbiology laboratory: Bacteria, fungi and parasites. In Mandell G.L., Douglas R.G., Bennett J.E. (editori): Principles and practice of infectious diseases, John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto.

Washington II J.A., Barry A.L. (1974): Dilution test procedures. In Lennette E.H., Spaulding E.H., Truant J.P. (editori): Manual of clinical microbiology, ed. II-a, American Society for Microbiology, Washington, pp.41o-417.

Scanned with OKEN Scanner

9. IDENTIFICAREA COCILOR GRAM-POZITIVI ASEZATI IN GRAMEZI

DUMITRU T. BUIUC

Staphylococcus
Micrococcus
Peptococcus

Cocii gram-pozitivi aşezaţi în grămezi sînt ubicuitari pe suprafeţele organismului. Contaminează frecvent probe ale diferitor produse patologice şi elemente de mediu (aer, alimente ş.a.). In probele de produse patologice trebuie diferenţiaţi cocii gram-pozitivi aşezaţi în grămezi contaminanţi de cei cu semnificaţie clinică.

Stafilococii au potenţial de patogenitate variabil. S.aureus este un condiţionat patogen frecvent implicat în infecţii: supuraţii cu diferite localizări, septicopioemii, toxiinfecţii alimentare; S.saprophyticus este un condiţionat patogen implicat în infecţii ale căilor urinare la femei tinere; S.epidermidis este un accidental patogen. Peptococii sînt condiţionat patogeni implicaţi în infecţii supurative mixte. Micrococii sînt nepatogeni.

9.1. Identificarea microscopică

Coci sferici de cca 1 µm diametru, dispuşi izolat, în perechi sau grămezi neregulate, rar în tetrade; gram-pozitivi, nesporulaţi, necapsulaţi. In produse patologice şi în culturi în faza staţionară apar gram-variabil; cei gram-negativi pot fi confundaţi cu neisseriile. Categoria microscopică pe care o reţinem practic este cea de stafilococi

9.2. Caractere de cultură

Cultivă pe medii uzuale. Capacitatea de a cultiva pe medii cu 15% clorură de sodiu este folosită la prepararea unor medii de cultură selective pentru stafilococi.

Stafilococii sînt facultativ anaerobi, peptococii sînt anaerobi iar micrococii aerobi.

Scanned with OKEN Scanner

Pe geloză-sînge, după 18-24 ore de incubare aerobă la 37°C, formează colonii de cca 2 mm diametru, bombate, lucioase, cu margini regulate (colonii S), opace, pigmentate.

Pigmentogeneza este variabilă. Staphylococcus aureus formează mai frecvent colonii cu pigment oranj, uneori alb sau galben. S.epidermidis formează colonii uzual cu pigment alb sau galben, uneori oranj, rar roşu. S.saprophyticus formează cel mai frecvent colonii cu pigment alb, uneori oranj sau galben.

Hemoliza. Coloniile de S.aureus cel mai frecvent sînt hemolitice, cele de S.epidermidis pot fi hemolitice iar cele de S.saprophyticus sînt nehemolitice.

9.3. Identificarea biochimică

Metabolizarea glucozei - testul O/F. Stafilococii metabolizează glucoza oxidativ şi fermentativ, micrococii numai oxidativ.

Coagulaza. Tulpinile de S.aureus produc coagulază în proporţie de ⩾96% Ceilalţi stafilococi sînt coagulazo-negativi.

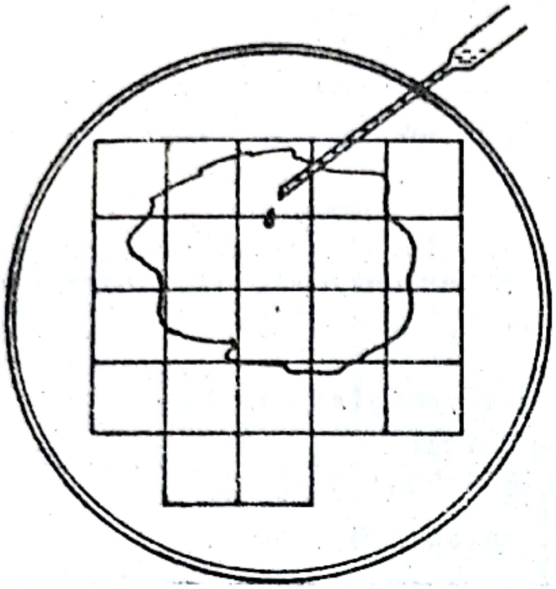
Depistarea coagulazei prin testul în tub: o,5 ml plasmă citratată de iepure (2 ml soluţie 5% citrat de sodiu + 8 ml sînge) diluată 1:4 cu soluţie salină izotonă într-un tub de lo/loo mm se însămînţează bogat cu o ansă din cultura de 24 ore pe geloză a tulpinii de testat. Tubul este incubat în baia de apă la 37°C. Se urmăreşte coagularea plasmei în intervalul de 1-18 ore.

Fermentarea manitei. In anaerobioză numai S.aureus produce acid din manită. Testul este util pentru identificarea acelui număr redus de tulpini coagulazo-negative de S.aureus.

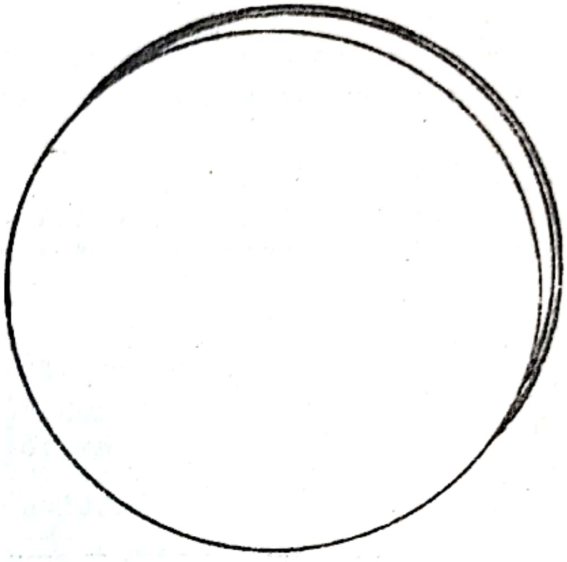
Sensibilitatea la novobiocină. S.aureus şi S.epidermidis sînt sensibili la novobiocină (CMI ⩽o,6 µg/ml). S.saprophyticus este rezistent (CMI ⩾2 µg/ml).

9.4. Antibiograma se impune pentru toate tulpinile de stafilococ cu semnificaţie clinică.

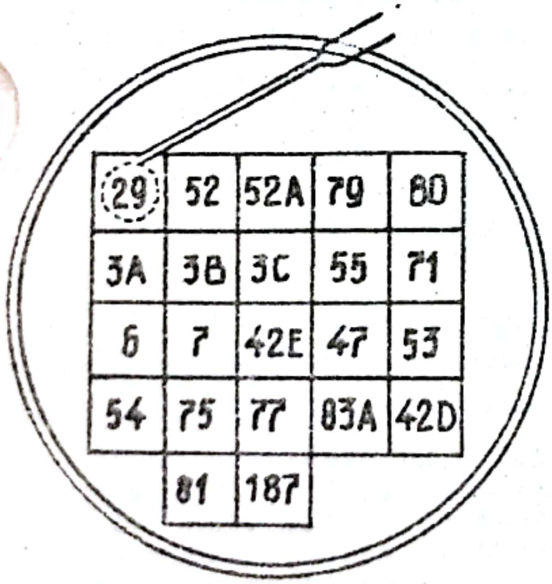
9.5. Tiparea fagică a tulpinilor coagulazo-pozitive de S.aureus este utilă epidemiologului pentru investigarea izbucnirilor epidemice de stafilococii nosocomiale (fig.9-1). Sînt tipate tulpinile cu semnificaţie clinică izolate de la pacienţii cu stafilococii şi tulpinile izolate din nasul purtătorilor (personal de spital), din aer, de pe suprafeţe. In conjunctură epidemică, de la bolnavi se izolează tulpini de S.aureus aparţinînd aceluiaşi lizotip agresiv, epidemigen (52, 52A, 8o, 81, 83A). Lizotipia



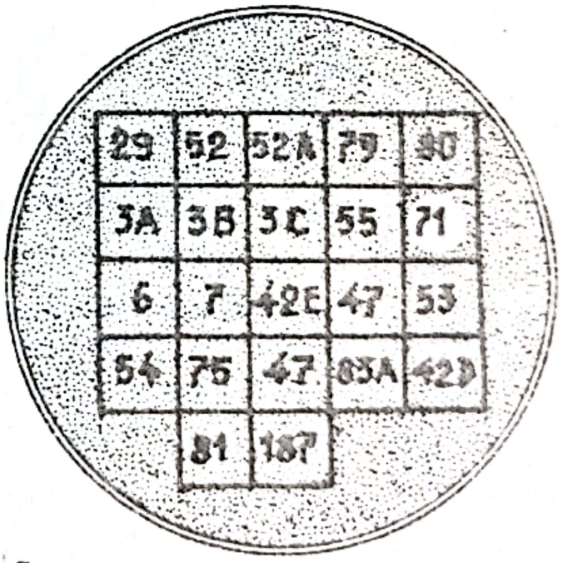
Pe fundul unei plăci cu agar-nutritiv se desenează o grilă cu un număr de patrate egal cu numărul de preparaţii fagice. Suprafaţa mediului este inundată cu cultura tulpinii de testat în bulion nutritiv în vîrstă de 4-5 ore la 37°C. Excesul de cultură este îndepărtat.



Placa este lăsată la temperatura camerei cu capacul întredeschis pînă cînd suprafaţa mediului se usucă complet (cca 3 ore).



In fiecare patrat se depune cu pipeta capilară 0,01 ml din preparaţia fagică corespunzătoare. După ce inoculum fagic s-a uscat perfect, plăcile sînt incubate peste noapte la 30°C.



Se citeşte aspectul lizei şi în raport cu aceasta se stabileşte lizotipul tulpinii. In exemplul dat, tulpina de S.aureus testată aparţine lizotipului 71.

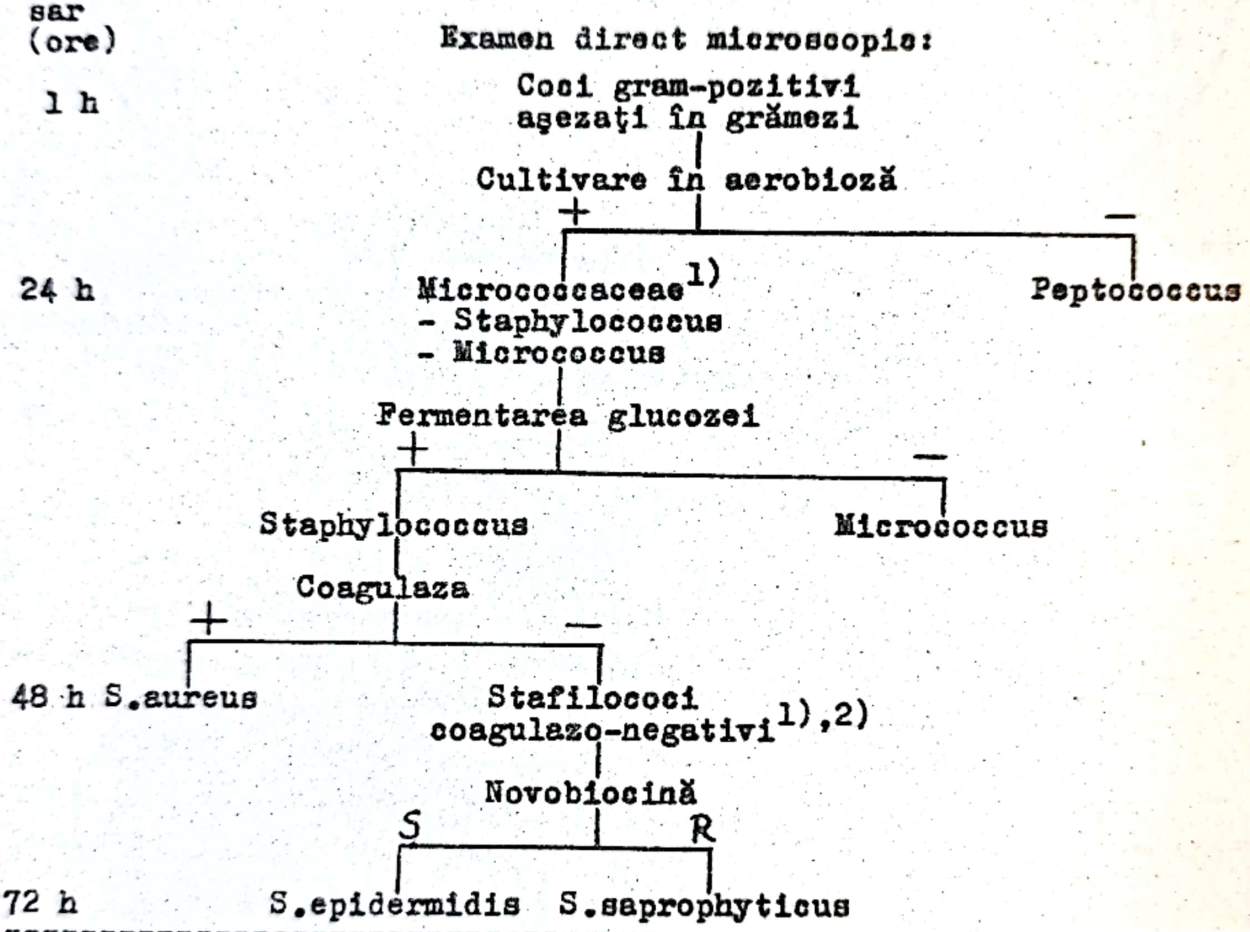
Fig.9-1 Lizotipia unei tulpini de S.aureus

stafilococilor este de competenţa laboratoarelor de referinţă.

I n c o n c l u z i e, cheia pentru identificarea cocilor gram-pozitivi aşezaţi în grămezi este prezentată în schema 9-1.

Schema 9-1

Algoritmul identificării cocilor gram-pozitivi aşezaţi în grămezi



1) Micrococii şi stafilococii coagulazo-negativi cu pigment alb se pot confunda cu streptococii nehemolitici, în special cînd se examinează numai frotiul din cultura pe geloză-sînge în care aşezarea în lanţuri a Streptococcus faecalis poate să nu fie evidentă. Cercetarea catalazei trangează diferenţierea: micrococcaceele sînt catalazo-pozitive, iar streptococii catalazo-negativi.

2) Tulpinile coagulazo-negative de S.aureus se identifică pe baza fermentării manitei în anaerobioză.

Notă: In urgenţă, izolaţii din hemocultură sau din alte produse patologice necontaminate pot fi testaţi direct pentru coagulază. Dacă coagulaza este prezentă, S.aureus este identificat astfel în 24 ore.

10. IDENTIFICAREA COCILOR GRAM-POZITIVI ASEZATI IN LANTURI

BUIUC T. DUMITRU

Streptococcii grup A (S.pyogenes)
Streptococcii grup C şi G
Streptococcii grup B (S.agalactiae)
Streptococcii grup D, inclusiv enterococcii
Streptococcii viridans (mai multe specii)
Pneumococcii (S.pneumoniae)
Peptostreptococcii (mai multe specii)

Streptococcus pyogenes, specie cu habitat uman izolată în cantităţi reduse din nasofaringele a 1o-3o% din persoanele normale, este un patogen implicat frecvent în variate infecţii (angine, piodermite, scarlatină ş.a.) grave prin complicaţiile infecţioase (sinuzite, otite, limfadenite, septicemii) şi postinfecţioase (febra reumatismală, glomerulonefrita difuză acută, coree).

Streptococcii grup C şi G au habitat mixt animal şi uman. Găzduiţi în nasofaringele sau pe tegumentele unor persoane normale, pot determina infecţii asemănătoare celor date de S.pyogenes.

S.agalactiae (streptococi grup B) are habitat animal şi uman. Găzduiţi uneori în orofaringele, intestinul şi vaginul unor persoane normale, sînt condiţionat patogeni implicaţi în infecţii ale nou născutului (septicemii, meningite), rar ale adultului (endocardite).

Streptococcii grup D, mai multe specii găzduite în colonul omului şi animalelor normale, sînt condiţionat patogeni implicaţi în infecţii ale tractusului urinar şi în endocardite subacute.

Streptococcii viridans, mai multe specii găzduite constant şi în număr mare la nivelul căilor aerodigestive superioare ale indivizilor normali, sînt accidental patogeni responsabili pentru >90% din endocarditele subacute.

S.pneumoniae, găzduit în nasofaringele a 3o-7o% din indivizii normali, este un condiţionat patogen care determină frecvent sinuzite, otite medii, infecţii ale tractusului respirator inferior; sînt o cauză frecventă a meningitelor purulente; mai rar determină peritonite ale fetiţelor.

Peptostreptococcii, găzduiţi normal în vagin, intestin şi căi-

10.1.

le aerodigestive superioare, sînt condiţionat patogeni implicaţi uneori în infecţii puerperale, endocardite subacute şi infecţii supurative mixte.

10.1. Identificarea microscopică: cocci sferici sau ovoizi cu diametrul de aproximativ 1 µm, aşezaţi izolat, în perechi sau lanţuri de lungime variată (mai scurte pe frotiul din produse patologice, mai lungi pe cel din cultura în bulion). Uneori enterococii, mai ales în cultura pe medii solide nu se dispun în lanţuri putînd fi confundaţi cu stafilococii şi micrococii (→ adnotarea 1) de la subsolul schemei 9-1).

Pneumococii virulenţi, pe frotiuri din produse patologice, sînt tipic capsulaţi, lanceolaţi sau ovalari, dispuşi în perechi sau scurte lanţuri cu axul lung în prelungire. Formele R, necapsulate, nu pot fi diferenţiate microscopic de streptococii viridans.

Practic, reţinem două categorii microscopice: streptococii şi pneumococii.

10.2. Caractere de cultură. Cele mai multe specii de streptococi sînt pretenţioase nutritiv. Mediul indicat pentru izolare şi identificare preliminară este geloza-sînge, pe care streptococii formează, după 18-24 ore de incubare aerobă la 37°C, colonii de cca 1 mm diametru sau mai mici şi se diferenţiază după aspectul hemolizei pe care o determină în

- streptococi α-hemolitici, colonii înconjurate cu o zonă de înverzire a mediului în care, microscopic, se mai observă hematii intacte;
- streptococi β-hemolitici, colonii înconjurate cu o zonă largă de hemoliză clară, completă;
- streptococi nehemolitici numiţi, tradiţional, şi γ-hemolitici (tabelul 10-1).

Pneumococii virulenţi formează colonii mucoide care după 24-96 ore se autolizează: uneori pe suprafaţa mediului de cultură rămîne numai urma coloniei, mai frecvent însă apare o depresiune în centrul coloniei.

Peptostreptococii sînt strict anaerobi şi formează după 48 ore la 37°C colonii nehemolitice.

Enterococii se particularizează prin capacitatea de a cultiva pe medii cu 6,5% NaCl.

10.3. Identificarea biochimică. In tabelul 10-1 sînt prezentate testele uzuale pentru individualizarea şi diferenţieri în cadrul streptococilor.

Tabelul 10-1

Caractere fiziologice utile pentru diferenţieri în cadrul streptococilor

Hemoliza pe gelozăsînge	Specia sau grupul	Catalaza[1]	Cultivarea pe mediul cu bilă-esculină[2]	Solubilizarea în bilă[3]	Sensibilitatea la optochin[4]	Sensibilitatea la bacitracină[5]	Hidroliza hipuratului[6]	Cultivarea în medii cu 6,5% NaCl
β[7]	S.pyogenes (grup A)	-	-	-	R[8]	S[9]	-	-
β	Streptococii grup C şi G	-	-	-	R	R	-	-
β/α/γ	S.agalactiae (grup B)	-	-	-	R	R	+	-
γ/α/β	Streptococii grup D enterococii	-	+	-	R	R	-	+
γ/α	alte specii grup D	-	+	-	R		-	-
α/γ	Streptococi viridans	-	-	-	R		-	-
α[10]	S.pneumoniae	-	-	+	S		-	-

1) Indicat cînd examenul microscopic nu depistează aşezarea caracteristică în lanţuri sau în grămezi a cocilor gram-pozitivi, iar coloniile nu sînt hemolitice sau pigmentogene; stafilococii şi micrococii sînt catalazo-pozitivi.

2) Streptococii care cultivă în prezenţa bilei şi fermentează esculina formează colonii negre.

3) Un volum din soluţia 1o% de taurocolat de sodiu adăugat la 1o volume suspensie de pneumococi în mediu cu pH neutru induce autoliza acesteia în 1o-6o minute la 37°C.

4) Rondele cu Ø 6 mm impregnate în soluţia 1:4ooo de optochin se depun în mijlocul unei arii dens însămînţate cu tulpina de testat; tulpina testată este sensibilă cînd Ø zonei de inhibiţie este >1o mm.

5) Ibid. impregnate cu o,5 UI bacitracină. Streptococii grup A sînt sensibili în proporţie de 98,3% iar cei non grup A rezistenţi la bacitracină în proporţie de 97,5%

6) Cultura tulpinii de testat se suspensionează dens în soluţia 1%

de hipurat de sodiu. Se menţine 2 ore la 37°C. Glicina rezultată din hidroliza hipuratului dă cu ninhidrina o culoare mov.

7) Un număr redus de tulpini care nu produc streptolizină S formează în aerobioză colonii α-hemolitice şi numai în anaerobioză colonii β-hemolitice.

8) R = rezistent; 9) S = sensibil.

10) In anaerobioză şi foarte rar în aerobioză formează colonii β-hemolitice.

10.4. Identificarea antigenică. Majoritatea streptococilor posedă un antigen de perete, polizaharidul C, pe baza căruia sînt împărţiţi în grupe serologice denumite cu litere majuscule de la A la H şi de la K la T (grupele antigenice Lancefield).

Identificarea grupului serologic al streptococilor se face prin reacţia de precipitare inelară folosind seruri specifice de grup şi un extract antigenic din cultura tulpinii de identificat (→5.2.1.1.) Principalele grupe serologice ale streptococilor implicate în infecţii ale omului au fost menţionate în introducerea capitolului şi în tabelul 10-1. Primul loc ca frecvenţă şi gravitate a infecţiilor determinate îl ocupă streptococii grup A (S.pyogenes). Tiparea serologică în cadrul grupului A prin reacţii de aglutinare pe lamă (identificarea antigenului proteic T) şi de precipitare inelară (identificarea antigenului proteic M) poate fi de interes epidemiologic şi este de competenţa laboratoarelor de referinţă.

Pneumococii sînt împărţiţi pe baza poliozidului capsular în 87 de serotipuri. Reacţia de umflare a capsulei este cel mai rapid şi specific test de identificare a pneumococilor virulenţi; poate fi realizat direct în preparatul microscopic din produsul patologic. Imunoelectroforeza contracurent identifică de asemenea rapid poliozidul capsular pneumococic în produsul patologic. Aceste teste sînt însă accesibile numai acelor laboratoare care posedă truse cu seruri de referinţă antipneumococice.

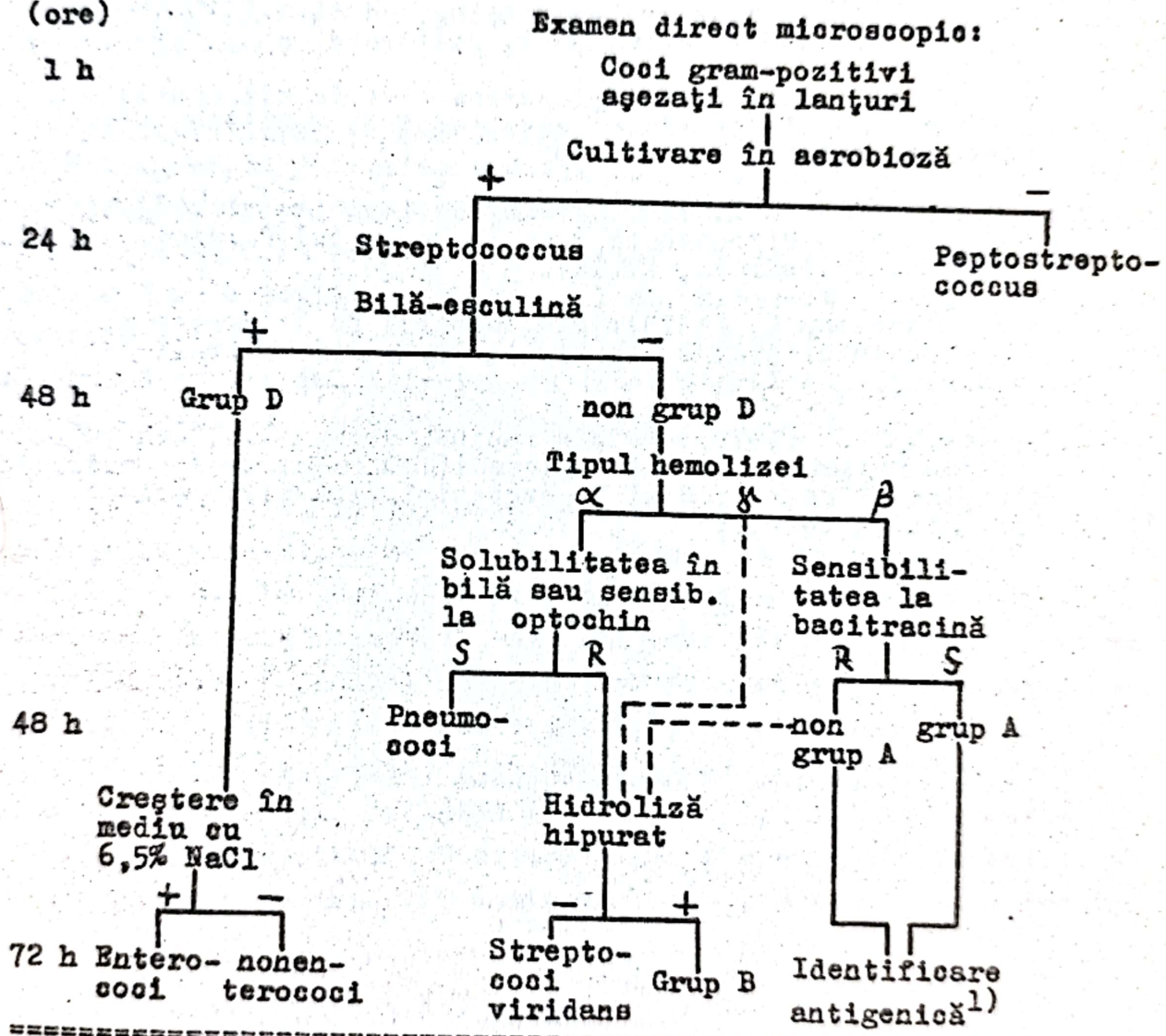
10.5. Antibiograma. S.pyogenes şi-a păstrat nealterată sensibilitatea naturală la penicilină, dar prezintă rezistenţă dobîndită, în proporţii variabile, faţă de celelalte antibiotice. De aceea, exceptînd infecţiile cu S.pyogenes la pacienţii care pot suporta tratamentul cu penicilină, antibiograma este indicată pentru toate tulpinile de Streptococcus cu semnificaţie clinică. Enterococii sînt cei care excelează prin multirezistenţa la antibiotice.

Scanned with OKEN Scanner

I n c o n c l u z i e , cheia pentru identificarea cocilor gram-pozitivi aşezaţi în lanţuri este prezentată în schema 10-1.

Schema 10-1

Algoritmul pentru identificarea cocilor gram-pozitivi aşezaţi în lanţuri



1) Laboratoarele care nu dispun de ser precipitant anti-grup B procedează la testul de hidroliză a hipuratului şi pentru identificarea tulpinilor β-hemolitice rezistente la bacitracină.

Notă: In laboratorul clinic, în funcţie de circumstanţele izolării, putem proceda direct la teste care vizează o specie de Streptococcus bine determinată. Astfel diplococii ovalari gram-pozitivi izolaţi din l.c.r. vor fi testaţi direct pentru solubilizarea în bilă şi pentru sensibilitatea la optochin, teste

care, dacă sînt pozitive, permit identificarea pneumococului infectant în 24-48 ore. Izolaţii β-hemolitici din exsudatul faringian al pacienţilor cu anginâ vor fi testaţi direct pentru sensibilitatea la bacitracină, test care permite identificarea prezumtivă a S.pyogenes în 48 ore.

BIBLIOGRAFIE

Debel R.H., Seeley H.W. (1975): Genus Streptococcus. In BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology, ediţia VIII-a, The Williams & Wilkins Company, Baltimore, pp.49o-5o9.

Mihalcu F. (1979): Actualităţi şi perspective în diagnosticul şi epidemiologia infecţiilor streptococice. Bacteriol.Virusol. Parazitol.Epidemiol., 24:129.

Mihalcu F., Posticescu R. (1979): Diagnosticul bacteriologic în infecţiile cu streptococi grup B. Bacteriol.Virusol. Parazitol.Epidemiol., 24:187.

Mihalcu F., Stănescu C. (1979): Diagnosticul de laborator al streptococului grup D. Bacteriol.Virusol.Parazitol. Epidemiol., 24:45.

Rusu V., Dorobăţ O. (1979): Metode rapide, accesibile, pentru determinarea grupului de streptococi, cu referire specială la streptococi de grup B şi D. Bacteriol.Virusol.Parazitol. Epidemiol., 24:115.

Scanned with OKEN Scanner

11. IDENTIFICAREA COCILOR GRAM-NEGATIVI

GABRIELA C. COMAN

Neisseria
Branchamella
Veillonella

N.meningitidis şi N.gonorrhoeae sînt înalt patogene pentru om. Meningococul determină rinofaringite, meningite, artrite, erupţii cutanate, endocardite în cadrul unor bacteriemii sau septicemii, uneori cu evoluţie fulminantă. Unele serogrupe au fost izolate din infecţii pulmonare. Cel mai frecvent infecţia meningococică evoluează inaparent la nivelul nasofaringelui. Gonococul determină în special infecţii cu transmitere sexuală: la bărbat, cel mai frecvent, infecţia evoluează zgomotos ca uretrită acută purulentă; la femeie localizarea la nivelul mucoasei endocolului este asimptomatică în mai mult de 6o% din cazuri. Netratate corect infecţiile gonococice se cronicizează putînd da complicaţii de vecinătate sau bacteriemice (cu localizări articulare în special) Viabilitatea ambelor specii este puternic influienţată de factori de mediu, ceea ce impune însămînţarea produselor patologice imediat după recoltare, pe medii adecvate preîncălzite la 37°C.

Celelalte neisserii, B.catarrhalis şi Veillonella spp fac parte din microbiota indigenă bucală, nasofaringiană, genitourinară sau intestinală. Ocazional, unele dintre aceste specii au fost implicate în infecţii meningiene sau ale tractusului respirator inferior.

11.1. Identificarea microscopică

Frotiul din produse patologice relevă o puternică reacţie inflamatorie cu polimorfonucleare, în care diplococi gram-negativi reniformi, cu feţele concave sau plane spre interior („în boabe de cafea"), sînt dispuşi extra- sau intracelular. Caracteristic în infecţia gonococică acută apar celule „burate" cu diplococi pe baza cărora poate fi susţinut diagnosticul. Diplococii gram-negativi sînt imobili, nesporulaţi şi în general nu au o capsulă vizibilă în frotiuri colorate Gram

sau cu albastru de metilen.

Frotiul din cultură poate evidenţia, mai ales în cazul celor două specii înalt patogene, cocii dezintegraţi prin autoliză.

11.2. Caractere de cultură

Meningococul şi gonococul sînt bacterii exigente nutritiv. Cultivă numai pe medii îmbogăţite în factori de creştere (sînge lacat de cal, extract de levură, autolizat de ficat). In aerobioză şi atmosferă umedă cu 3-5% CO_2, formează, după 24-48 ore la 37°C, colonii S de 1-2 mm diametru, rotunde sau lobate, nepigmentate, nehemolitice. Izolarea meningococilor şi gonococilor din produse contaminate se face pe medii selective cu antibiotice (vancomicină sau lincomicină, colimicină şi nistatin).

Celelalte neisserii şi B.catarrhalis sînt facultativ anaerobe şi cultivă în 24 ore la 37°C pe geloză nutritivă (neisserii „nepretenţioase"). Pe geloză-sînge cultivă şi la 22°C. N.flava, N.flavescens, N.lactamica formează colonii S pigmentate în galben, N.mucosa colonii mucoide, N.sicca colonii R cu suprafaţa încreţită, uneori pigmentate. Coloniile de B.catarrhalis seamănă cu cele de meningococ şi gonococ. Speciile de Veillonella sînt anaerobe.

11.3. Identificarea biochimică. Neisseriile dau testul oxidazei pozitiv (⟶3.3.2.). Fermentarea zaharurilor este cea care diferenţiază speciile de Neisseria: meningococul fermentează glucoza şi maltoza, gonococul numai glucoza, iar speciile „nepretenţioase" se particularizează prin variate spectre fermentative. B.catarrhalis este nezaharolitică.

11.4. Identificarea serologică. Meningococul este identificat serologic prin seruri specifice de grup (grupe definitive: A,B,C,D; grupe provizorii: X,Y,Z,29E,W135) în reacţii de aglutinare pe lamă (identificarea tulpinilor izolate în cultură pură) sau imunoelectroforeză discontinuă contracurent (depistarea poliozidului meningococic direct în produse patologice). De la pacienţi cu meningită se izolează mai frecvent tulpini din serogrupele A,B şi C.

11.5. Antibiograma. Meningococii îşi păstrează încă sensibilitatea naturală la penicilina G, ampicilină şi cloramfenicol, antibiotice cu bună penetrabilitate în l.c.r. Pentru gonococ, în condiţiile epidemiologice ale R.S.R. unde încă nu s-au semnalat tulpinile producătoare de beta-lactamază, circulante în alte zone geografice, antibiograma este indicată numai la nivelul laboratoarelor de referinţă.

Scanned with OKEN Scanner

12. IDENTIFICAREA BACILILOR GRAM-NEGATIVI AEROBI SAU FACULTATIV ANAEROBI

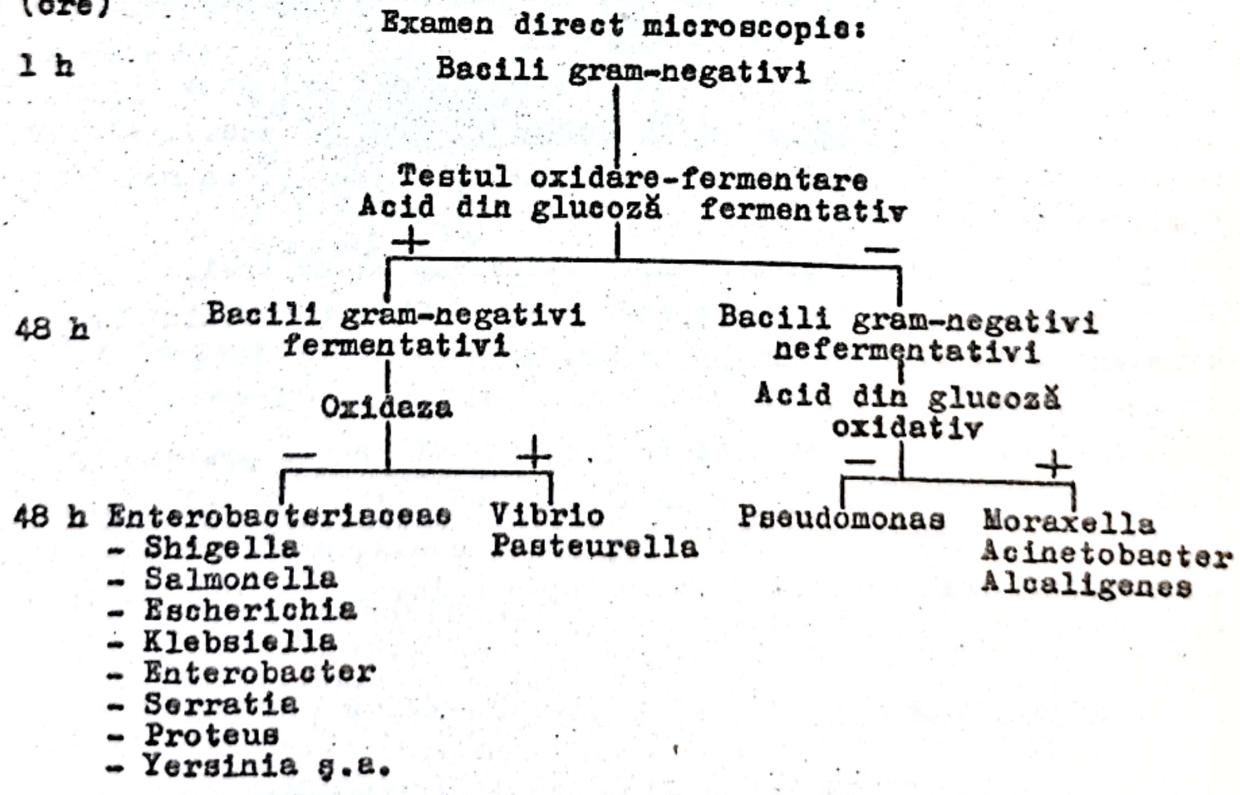
DUMITRU T. BUIUC

Atît posibilităţile examenului microscopic cît şi cele ale caracterelor de cultură de a stabili diferenţieri în categoria largă a bacililor gram-negativi aerobi sau facultativ anaerobi sînt cu totul limitate. De aceea caracterizarea biochimică are o pondere deosebită în practica identificării acestor bacterii.

12.1. Identificarea preliminară (schema 12-1)

Schema 12-1

Algoritmul identificării bacililor gram-negativi aerobi sau facultativ anaerobi



(continuare pe pagina următoare)

Schema 12-1
(continuare)

Notă: In microbiologia medicală, pentru a urgenta identificarea, ne bazăm pe probabilitatea că o anumită bacterie determină şi se izolează dintr-un anumit (e) proces infecţios. De exemplu, Shigella spp. determină diaree dizenteriformă. In acest caz izolaţii vor fi triaţi pentru testele particulare acestei bacterii ceea ce, evident, scurtează timpul necesar identificării. In caz de rezultat negativ însă, întregul algoritm trebuie repetat etapă cu etapă.

==========

Shigellele sînt o cauză frecventă a enteritelor inflamatorii: dizenteria bacilară.

Salmonellele cu habitat uman (S.typhi, S.paratyphi A, S.schottmuelleri, S.hirschfeldi) determină enterite de tip penetrant (febre enterice), iar cele cu habitat mixt, animal-uman, sînt o cauză frecventă de toxiinfecţii alimentare şi pot determina, la pacienţi cu deficienţe ale apărării antiinfecţioase, septicemii.

Yersinia pestis este agentul etiologic al ciumei. Y.pseudotuberculosis şi Y.enterocolitica sînt cauza unor enterite de tip penetrant care pot evolua cu adenite mezenterice şi septicemie.

Escherichia coli este astăzi una din cele mai frecvente cauze de infecţii cu variate localizări.

Enterocacteriaceele comensale condiţionat patogene (Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Proteus ş.a.), alături de bacilii gram-negativi nefermentativi au devenit cea mai importantă cauză de infecţii nosocomiale.

Vibrio cholerae este agentul etiologic al holerei.

Pasteurella determină accidental infecţii ale omului în circumstanţe particulare (muşcături de animale ş.a.)

Nivelul pînă la care se conduce identificarea practică a bacililor din acest numeros grup depinde de circumstanţele izolării (materii fecale, produse normal sterile ş.a.), semnificaţia clinică a izolaţilor, necesităţile epidemiologice şi competenţa laboratorului.

12.2. Identificarea enterobacteriaceelor

12.2.1. Identificarea microscopică: bacili gram-negativi de o,4-

0,7/1-3 µm, izolaţi sau în perechi. Obişnuit monomorfi, uneori Proteus poate fi polimorf (forme coccoide, filamentoase, sferoplaşti). Sînt mobili, cu excepţia genurilor Shigella, Klebsiella şi a bacilului pestei. Unii pot fi capsulaţi (Klebsiella, Escherichia, rar Salmonella)

Practic, reţinem categoria microscopică de enterobacteriacee.

12.2.2. Caractere de cultură. După 24 ore de incubare aerobă sau anaerobă la 37°C, enterobacteriaceele formează pe geloză nutritivă, ca şi pe medii selective cu bilă, colonii mari de 2-4 mm diametru, S, rotunde, uşor convexe, cenuşii. Tulpinile capsulate formează colonii mucoide. Din ansamblul enterobacteriaceelor, excepţii fac numai

- unele specii de Proteus (P.vulgaris, P.mirabilis şi uneori P.rettgeri) care invadează activ suprafaţa mediilor uzuale cu o peliculă fină de cultură (pe medii cu bilă formează însă colonii indistincte de ale altor enterobacteriacee);
- Serratia care formează frecvent colonii pigmentate în roz sau în roşu.

12.2.3. Identificarea biochimică

Capacitatea de a fermenta lactoza diferenţiază enterobacteriaceele în

lactozopozitive	şi	lactozonegative
Escherichia		Shigella
Klebsiella		Salmonella
Enterobacter		Proteus
Serratia ş.a.		Yersinia ş.a.

Caracterul este larg aplicat în prepararea mediilor diferenţiale utilizate pentru izolarea enterobacteriaceelor din produse contaminate şi numai facultativ la izolarea lor din produse necontaminate.

Se identifică biochimic numai enterobacteriaceele cu semnificaţie clinică:

● Din produse patologice necontaminate (sînge, l.c.r. ş.a.): toţi izolaţii.

● Din urină, spută, bilă: izolaţii care îndeplinesc criterii cantitative de implicare etiologică (→ 24., 26.) şi, din urină şi bilă, la avizarea prealabilă a laboratorului, Salmonella typhi.

● Din materiile fecale sîntem interesaţi în primul rînd de identificarea patogenilor majori lactozonegativi: Shigella, Salmonella, eventual Yersinia enterocolitica. Dintre enterobacteriaceele lactozopozitive sîntem interesaţi de tulpinile enteropatogene infantile de E.coli la pacienţii diareici sub vîrsta de doi ani. Restul enterobacteriaceelor izolate din materiile fecale sînt trecute cu vederea ca saprofiţi de contaminare normală. Sînt luate în studiu numai în acele situaţii în care un enteropatogen recunoscut (Shigella, Salmonella etc.) nu a fost izolat. Dar aceste situaţii (cercetarea tulpinilor enterotoxigene sau enteroinvazive de E.coli, a celor enterotoxigene de Klebsiella, Citrobacter) sînt încă de competenţa cercetării ştiinţifice şi nu a laboratorului de rutină.

Identificarea enterobacteriaceelor trebuie condusă pînă la stadiul care să permită

● clinicianului confirmarea diagnosticului clinic (febră tifoidă, dizenterie ş.a.) şi diferenţierea recăderii de reinfecţie*)

● epidemiologului confirmarea diagnosticului de epidemie, identificarea tulpinii epidemice**), depistarea purtătorilor sănătoşi de Salmonella sau Shigella.

Triajul biochimic preliminar al izolaţilor din materii fecale orientează rapid şi economic asupra identităţii lor probabile Pe mediile de izolare coloniile lactozo-negative ale enterobacteriaceelor patogene (Shigella, Salmonella, Yersinia) nu pot fi deosebite de coloniile lactozonegative ale enterobacteriaceelor condiţionat patogene pentru care identificarea completă de regulă nu este necesară (Proteus ş.a.)

Mediul Hajna este o geloză nutritivă care conţine 2 zaharuri - glucoza şi lactoza -, roşu fenol ca indicator pentru fermentare şi sulfat feros ca indicator pentru producerea de H_2S. Mediul se repartizează în tuburi în coloană şi în pantă. Mediul neînsămînţat are culoarea roşie ca cireaşa. Însămînţarea se face cu acul prin înţepare în coloană şi etalare pe pantă (fig.12-1). După 18-24 ore la 37°C se face citirea tuburilor (tabelul 12-1).

*) In recăderi se reizolează aceeaşi tulpină (biotip, serotip) pe cînd în reinfecţii se izolează tulpini diferite.

**) Tulpinile izolate din epidemie aparţin aceluiaşi serotip sau lizotip.

Mediul M.I.U. (mobilitate-indol-urează) este o geloză nutritivă moale care conţine uree şi roşu fenol ca indicator de pH. Mediul se repartizează în tuburi în coloană. După însămînţarea în profunzimea coloanei prin înţepare unică cu acul, se ataşează la dop o bandă de hîrtie indicator plasînd la 1cm de suprafaţa mediului capătul impregnat cu reactiv Ehrlich (fig.12-1). Citirea tuburilor se face după 24-48 ore de incubare la 37°C (tabelul 12-2).

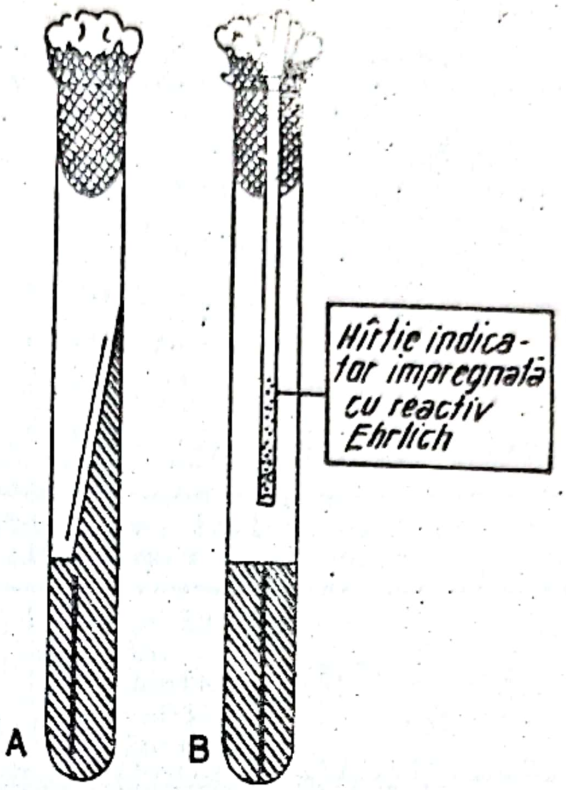


Fig.12-1 Mediul Hajna (A) şi mediul M.I.U. (B): modul de însămînţare

Stabilirea identităţii probabile a izolaţilor funcţie de rezultatele reacţiilor pe mediile de triaj preliminar este prezentată în tabelul 12-3.

Tabelul 12-1

Citirea reacţiilor pe mediul Hajna

Reacţia	Interpretarea
Coloana galbenă (acidă) Panta roşie (alcalină)	Fermentată numai glucoza.)
Coloana galbenă (acidă) Panta galbenă (acidă)	Fermentate glucoza şi lactoza
Coloana roşie (alcalină) Panta roşie (alcalină)	Cultură nefermentativă
Bule de gaz în coloană	Cultură gazogenă
Innegrire în coloană	Producere de H_2S

.) Pentru a permite detectarea culturilor care fermentează numai glucoza, în mediu raportul între glucoză şi lactoză este de 1:10. Astfel, fermentarea glucozei duce la apariţia unor cantităţi reduse de acizi care sînt oxidaţi rapid în panta care rămîne alcalină.

Identificarea biochimică a enterobacteriaceelor lactozo-pozitive este prezentată în tabelul 12-4 iar a celor lactozo-negative

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 12-2

Citirea reacţiilor pe mediul M.I.U.

Reacţia	Interpretarea
Coloana clară cu opacifiere strict limitată la traiectul de însămînţare	Bacterie imobilă
Coloana opacifiată	Bacterie mobilă
Coloana galbenă (acidă)•)	Ureaza absentă
Coloana roşie (alcalină)	Ureaza prezentă
Hîrtia indicator galbenă	Indolul absent
Hîrtia indicator roşie	Indolul prezent

•)Un inel roşu limitat la suprafaţa mediului semnifică o alcalinizare nespecifică a mediului.

în tabelul 12-5.

12.2.4. Identificarea antigenică a enterobacteriaceelor

In activitatea de rutină laboratoarele dispun numai de truse pentru identificarea principalelor enterobacteriacee enteropatogene:

- Shigella,
- Salmonella mai frecvent izolate în R.S.R.,
- Escherichia coli, tulpinile enteropatogene infantile.

12.2.4.1. Identificarea tulpinilor enteropatogene infantile de Escherichia coli. Acestea nu pot fi diferenţiate biochimic de restul tulpinilor. Se identifică numai antigenic, prin antigenul B (variantă a antigenului de înveliş K) pe care îl posedă (tabelul 12-6).

Cinci colonii lactozo-pozitive din coprocultură se aglutinează pe lamă cu ser polivalent anti-E.coli enteropatogenă infantilă (⟶ 5.2.1.2.1.) Dacă reacţia este negativă se mai face o aglutinare cu cultura lactozo-pozitivă confluentă. Coloniile care au aglutinat cu serul polivalent se repică pe mediul diferenţial lactozat în vederea aglutinării pe lamă cu seruri monovalente. Rezultatele pozitive trebuie verificate prin aglutinare cu serul monovalent în tuburi (⟶ 5.2.1.2.2. şi 5.3.) Dacă serul polivalent a aglutinat numai cultura confluentă, repicarea se face dintr-un flocon aglutinat în picătura de ser polivalent.

Tabelul 12-3

Identitatea probabilă a bacililor gram-negativi nepretenţioşi nutritiv în funcţie de rezultatele triajului biochimic preliminar

Reacţii pe mediu Hajna				Ureaza în mediul M.I.U.	
				Ureazonegativ	Ureazopozitiv
				Identitatea probabilă	
Panta:	acid	lactoză	+	Escherichia	
Coloana:	acid	glucoză	+	Citrobacter H_2S -[1]	
Coloana:	gaz sau	, H_2S	-	Klebsiella[1]	
				Enterobacter[1]	
Panta:	acid	lactoză	+	Citrobacter H_2S +[1]	
Coloana:	acid	glucoză	+	Arizona	
Coloana:	gaz +	, H_2S	+	(lactozopozitiv)	
Panta:	alcalin	lactoză	-	Salmonella	
Coloana:	acid	glucoză	+	Arizona	Proteus:
Coloana:	gaz +	, H_2S	+	Citrobacter	P.vulgaris
				(Bethesda)	P.mirabilis
				Edwardsiella	
Panta:	alcalin	lactoză	-	Escherichia	Proteus:
Coloana:	acid	glucoză	+	(lactoză -)	P.morganii
Coloana:	gaz +	, H_2S	-		P.rettgeri
Panta:	alcalin	lactoză	-	Salmonella[2]	
				Shigella	
Coloana:	acid	glucoză	+	Escherichia	Proteus:
Coloana:	gaz -	, H_2S	-	(lactoză -)	P.rettgeri
				(anaerogenă)	
				Providencia	
				Serratia	
Panta:	alcalin	lactoză	-	Pseudomonas	
Coloana:	alcalin	glucoză	-	sau alţi bacili	
Coloana:	gaz -	, H_2S	-	gram-negativi	
				nefermentativi	

[1] Unele tulpini pot produce tardiv urează.

[2] Salmonella typhi produce o cantitate mică de H_2S şi numai rar gaz.

Colorarea directă cu anticorpi fluorescenţi a frotiului din proba de materii fecale este o metodă rapidă de depistare a tulpinilor enteropatogene infantile de E.coli.

12.2.4.2. Identificarea antigenică a salmonelelor începe prin aglutinarea pe lamă cu ser polivalent anti-O. Dacă această reacţie este pozitivă, identificarea se continuă prin reacţii de agluti-

Tabelul 12-4

Identificarea biochimică a enterobacteriaceelor lactozo-pozitive

Testul	Escherichia	Citrobacter	Klebsiella pneumoniae	Enterobacter cloacae	Enterobacter aerogenes
Teste primare					
Mobilitate	$\overset{+}{\underset{-}{\text{sau}}}$	+	-	+	+
Indol	+	-	-	-	-
Ureză	-	(+)	(+)	$\overset{+}{\underset{-}{\text{sau}}}$	-
Roşu metil	+	+	$\overset{-}{\underset{+}{\text{sau}}}$	+	+
Voges-Proskauer	-	-	+	+	+
Citrat (mediu Simmons)	-	D	+	+	+
H_2S (mediu Hajna)	-	D	-	-	-
Carbohidraţi (acid din)					
Lactoză	$\overset{+}{\underset{-}{\text{sau}}}$ x	$\overset{+}{\underset{-}{\text{sau}}}$ x	+	$\overset{+}{\underset{(+)}{\text{sau}}}$	+
Inozită	-	-	+G	d	+G
Sucroză	d	d	+	+	+
Teste adiţionale					
Adonită	-	-	$\overset{+}{\underset{-}{\text{sau}}}$	$\overset{-}{\underset{+}{\text{sau}}}$	+
Dulcită	d	$\overset{+}{\underset{-}{\text{sau}}}$	$\overset{-}{\underset{+}{\text{sau}}}$	$\overset{-}{\underset{+}{\text{sau}}}$	-
Malonat	-	$\overset{-}{\underset{(+)}{\text{sau}}}$	+	$\overset{+}{\underset{-}{\text{sau}}}$	$\overset{+}{\underset{-}{\text{sau}}}$
KCN	-	+	+	+	+
Phenilalanină (dezaminază)	-	-	-	-	-
Lizin decarboxilază	+	-	+	-	+
Ornitin decarboxilază	d	d	-	+	+
Arginin dihidrolază	d	+	-	+	-
Gelatină (22°C)	-	-	-	$\overset{(+)}{\underset{-}{\text{sau}}}$	$\overset{-}{\underset{(+)}{\text{sau}}}$

Legenda:

+ = 90% din tulpini pozitive în 1-2 zile,
- = 90% din tulpini negative
(+) = pozitiv tardiv,
$\overset{+}{\underset{-}{\text{sau}}}$ = majoritatea tulpinilor pozitive,
$\overset{-}{\underset{+}{\text{sau}}}$ = majoritatea tulpinilor negative

x= tîrziu şi neregulat pozitiv
D= diferite reacţii, + (+) sau -, date de diferite specii ale genului,
d= ibid. date de diferite tulpini ale speciei sau serotipuri.

Tabelul 12-5

Identificarea biochimică a enterobacteriaceelor lactozo-negative

Testul	Salmonella	S.typhi	Arizona[1]	Shigella	Serratia	Proteus vulgaris	P.mirabilis	P.rettgeri	P.morganii	Providencia	Yersinia
Teste primare											
Mobilitate (37°C)	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Indol	-	-	-	D	-	+	-	+	+	+	D
Urează	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	D
H_2S (mediu Hajna)	+	d	+	-	-	+	+	-	-	-	D
Carbohidraţi (acid din)											
Lactoză	-	-	d	D	sau (+)	-	-	-	-	-	-
Glucoză	+G	+	+G	+[2]	d	+G sau -	+G	+	+G	D	+
Dulcită	D	sau (+)	-	d	-	-	-	-	-	-	-
Manită	+	+	+	D	+	-	-	+ sau -	-	D	+
Sucroză	-	-	-	D	+	+	d	d	-	D	D
Pigment pe geloză	-	-	-	-	sau +	-	-	-	-	-	-
Teste adiţionale											
Salicină	-	-	-	-	+	d	d	d	-	-	D
Voges-Proskauer	-	-	-	-	+	-	sau +	-	-	-	-
Citrat (mediu Simmons)	+	-	+	-	+	d	+ sau (+)	+	-	+	-
Malonat	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
KCN	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Phenilalanină (dezaminază)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Lizindecarboxilază	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Ornitin-decarboxilază	+	+	+	D	+	-	+	-	+	-	D
Arginindihidrolază	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatină (22°C)	-	-	(+)	-	+	+	+	-	-	-	-

Legenda: vezi subsolul tabelului 12-4

1) In ed.VIII-a a Bergey's Manual, Arizona îşi pierde individualitatea de gen; i-am păstrat individualitatea numai pentru raţiuni privind practica identificării în laboratorul de microbiologie clinică.

2) Unele biotipuri de Shigella flexneri produc gaz .

Tabelul 12-6

Tipurile serologice enteropatogene infantile de Escherichia coli circulante în R.S.R.

E.coli $O_{26}B_6$	E.coli $O_{124}B_{17}$
E.coli $O_{55}B_5$	E.coli $O_{125}B_{15}$
E.coli $O_{86}B_6$	E.coli $O_{126}B_{16}$
E.coli $O_{111}B_4$	E.coli $O_{127}B_8$
E.coli $O_{119}B_{14}$	E.coli $O_{128}B_{12}$

nare cu seruri anti-O de grup*) După stabilirea grupului, printr-o reacţie de aglutinare cu seruri anti-H se face identificarea serotipului*) In tabelul 12-7 este prezentată structura antigenică a unor salmonelle mai frecvent izolate.

Tabelul 12-7

Structura antigenică a salmonellelor mai frecvent izolate (după Kauffmann şi White)

Specii/serotipuri	Boala la om	Antigen somatic	Antigen flagelar Faza 1	Faza 2
		Grupa A		
S.paratyphi A	febră paratifoidă	1,2,12	a	-
		Grupa B		
S.schottmuelleri (S.paratyphi B)	febră paratifoidă	1,4,5,12	b	1,2
S.typhimurium	enterite, mai rar septicemii	1,4,5,12	i	1,2
S.heidelberg		1,4,5,12	r	1,2
S.wien		1,4,12,27	b	1,w
S.agona		1,4,12	f,g,s	-
		Grupa C_1		
S.hirschfeldii (S.paratyphi C)	febră paratifoidă	6,7 Vi	c	1,5
S.choleraе-suis	enterite, mai rar septicemii	6,7	c	1,5
		Grupa C_2		
S.newport		6,8	e,h	1,2
S.bovis-morbificans		6,8	r	1,5
		Grupa D_1		
S.typhi	febră tifoidă	9,12 Vi	d	-
S.enteritidis	enterite, mai rar septicemii	1,9,12	g,m	-
		Grupa E_1		
S.anatum		3,10	e,h	1,6

*) Salmonellele sînt cuprinse în 49 grupe serologice cu peste 1500 de serotipuri.

Dacă triajul biochimic preliminar sugerează S.typhi şi izolatul nu aglutinează cu serul polivalent anti-O, se efectuează aglutinarea cu serul anti-Vi (antigenul O este mascat de antigenul de înveliş Vi).

Tiparea fagică. In scopuri epidemiologice, pentru unele salmonele (S.typhi, S.paratyphi B, S.typhimurium) se poate efectua tiparea fagică. Sînt determinări de competenţa laboratoarelor de referinţă.

12.2.4.3. Identificarea antigenică a celor 4 specii de Shigella (tabelul 12-8) presupune de asemenea o reacţie de aglutinare pe lamă cu seruri de grup (A, B, C, D). In cadrul fiecărei subgrupe,

Tabelul 12-8

Diferenţierea biochimică a subgrupelor (speciilor) de Shigella

Subgrupa	Specia	Lactoză	Manită	Indol	Număr de serotipuri
A	S.dysenteriae	-	-	d	10
B	S.flexneri	-	+	d	6
C	S.boydii	-	+	d	15
D	S.sonnei	(+)	+	-	1

serotipurile sînt stabilite prin reacţia de aglutinare pe lamă cu seruri monovalente.

Pentru restul enterobacteriaceelor, identificarea antigenelor ca markeri epidemiologici (serotip etc.) este, ca şi identificarea altor markeri epidemiologici (lizotipul pentru S.typhi ş.a.), de competenţa laboratoarelor naţionale de referinţă.

12.2.5. Totuşi, la dispoziţia majorităţii laboratoarelor sînt cîteva testări simple de mare utilitate în identificarea unor enterobacteriacee, dar utilizate în insuficientă măsură.

Inocularea la şoarece ca test pentru identificarea serotipurilor K_1 şi K_2 ale Klebsiella pneumoniae. In infecţiile respiratorii sînt implicate serotipurile K_1-K_3 ale K.pneumoniae, bacterie uneori dificil de identificat biochimic din cauza variabilităţii unor reacţii. Tulpinile serotipurilor K_1 şi K_2 sînt înalt virulente pentru şoarece, în timp ce tulpinile altor serotipuri sînt nepatogene sau numai slab virulente. Soarecii inoculaţi intraperitoneal cu 0,1 ml din diluţia 10^{-5} a culturii de 18 ore în apă pep-

tonată a unei tulpini de K.pneumoniae serotip K_1 sau K_2 fac o infecţie septicemică mortală în 24-72 ore. Examenul microscopic al amprentelor de splină colorate Gram depistează K.pneumoniae cu morfologia caracteristică: bacil scurt şi gros, izolat sau în perechi, gram-negativ, capsulat. Inocularea la şoarece este astfel şi o modalitate de izolare şi identificare a K.pneumoniae din spută.

Fenomenul Dienes ca marker epidemiologic pentru tulpinile de Proteus vulgaris şi P.mirabilis. Pe suprafaţa unui mediu de cultură fronturile invazive a două tulpini identice de Proteus confluează, iar cele a două tulpini diferite se opresc la distanţă de 2-3 mm unul de altul. Deci culturile tulpinilor de Proteus izolate de la sursa de infecţie şi de la pacienţii infectaţi de către aceasta într-o izbucnire epidemică, atunci cînd sînt însămînţate în puncte diferite pe aceeaşi placă, vor conflua fiind identice

12.2.6. Antibiograma se impune pentru toate enterobacteriaceele cu semnificaţie clinică.

12.3. Identificarea vibrionilor holerigeni

Vibrionii holerigeni sînt reuniţi în biotipurile cholerae şi eltor ale speciei Vibrio cholerae. Un alt biotip, proteus, al acestei specii determină diarei benigne („cholera nostras").

12.3.1. Identificarea microscopică. Bacili gram-negativi de 0,5/1,5-3 μm, care în primoculturi apar frecvent încurbaţi în formă de virgulă. In subculturi predomină formele drepte. Foarte mobili.

12.3.2. Caractere de cultură. Cultivă pe medii uzuale, optim la 37°C şi pH 8,0, preferenţial în aerobioză, mai lent în anaerobioză. Poate cultiva pînă la pH 9,5, dar creşterea încetează la pH 6,5. In condiţii optime de cultivare mediile lichide însămînţate cu vibrion holeric devin opalescente cu văl fin la suprafaţă după cca 6 ore de incubare. Pe suprafaţa mediilor solide formează după 18 ore de incubare colonii mari S, transparente cu irizaţii verzi albăstrui pînă la roşu bronz cînd sînt examinate în iluminare oblică. Cultivă bine în prezenţa sărurilor biliare.

Capacitatea vibrionului holeric de a culpiva optim la pH al-

calin îl individualizează faţă de toate celelalte bacterii izolate din infecţii sau din microbiota indigenă a omului.

12.3.3. Identificarea biochimică şi antigenică. Vibrionii holerigeni pot fi identificaţi pe baza testelor prezentate în tabelul 12-9.

Tabelul 12-9

Caractere diferenţiale ale biotipurilor de V.cholerae

Caracterul	biotipul cholerae	eltor	proteus	albensis
Fermentarea arabinozei	-	-	-	-
Fermentarea manozei	+	+	+	-
Fermentarea sucrozei	+	+	+	+
Reacţia roşu holera[1]	+	+	-	-
Reacţia Voges-Proskauer la 22°C	-	+	d	+
" " " 37°C	d	+	d	+
Hemoliza (în tub)[2]	-	d	+	-
Aglutinarea prin ser anti O:1	+	+	-	-

[1] Patru picături de acid sulfuric adăugate la cultura de 24-48 h în apă peptonată a vibrionilor holerigeni determină apariţia unei culori roşii (reacţia roşu holera sau indol-nitroasă pozitivă)

[2] La 1 ml cultură de 48 ore în apă peptonată se adaugă 1 ml suspensie 5% de eritrocite de berbec.

Cele 3 serotipuri ale vibrionilor holerigeni se identifică prin reacţii de aglutinare pe lamă (confirmate de aglutinarea în tub) folosind 2 seruri aglutinante specifice, anti-Ogawa şi anti-Inaba, conform schemei din tabelul 12-1o.

Tabelul 12-1o

Identificarea antigenică a vibrionilor holerigeni

Serotipul	Factori antigenici O	Aglutinare prin seruri specifice: Anti-B (Ogawa)	Anti-C (Inaba)
Ogawa	AB	+	-
Inaba	AC	-	+
Hikojima	ABC	+	+

Antibiograma se impune pentru toţi vibrionii holerigeni.

12.4. Identificarea bacililor gram-negativi nefermentativi

Din această categorie de bacterii cel mai frecvent izolat

din infectii este bacilul piocianic, Pseudomonas aeruginosa.

Microscopic, P.aeruginosa apare ca bacili gram-negativi de o,5-o,8/1,5-3 µm, izolaţi, în perechi sau în scurte lanţuri.

Identificarea practică a bacilului piocianic se face pe baza caracterelor de cultură. Pe geloză nutritivă dezvoltă după 24 ore de incubare aerobă la 37°C colonii mari, uşor convexe, cu luciu metalic şi margini neregulate care tind să invadeze mediul în imediata vecinătate. Cultura degajă un miros caracteristic de iasomie. Pe geloză-sînge coloniile sînt hemolitice. Produce un pigment verde fluorescent, fluoresceina, şi unul albastru, piocianina, ambii difuzibili în mediu. Puţine tulpini produc un pigment roşu închis. Aproximativ 4% din tulpinile bacilului piocianic nu produc piocianină. Se diferenţiază de alte specii de Pseudomonas prin capacitatea de a oxida gluconatul în keto-gluconat, de a cultiva la 42°C şi de a cultiva pe medii cu cetrimid.

Antibiograma este indispensabilă pentru toate tulpinile cu semnificaţie clinică.

BIBLIOGRAFIE

BERGEY'S Manual (1975): Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, ed.VIII-a, The Williams & Wilkins Company, Baltimore, pp. 217-237; 29o-293; 293-296; 298-318; 318-321; 321-324; 327-33o; 33o-332; 34o-345.

Pickett M.J., Manclark C.R. (1970): Nonfermentative bacilli associated with man. I. Nomenclature. Am.J.Clin.Path., 54:155.

Pickett M.J., Pedersen M.M. (1970): Nonfermentative bacilli associated with man. II. Detection and identification. Am.J. Clin.Path., 54:164.

Rusu V. (1970): Yersinia enterocolitica în patologia umană. Microbiologia.(Bucureşti), 15:11.

Sabath L.D. (1980): Pseudomonas aeruginosa. The organism, diseases it causes, and their treatment. Hans Huber Publishers, Berna, Stuttgart, Viena.

Scanned with OKEN Scanner

13. IDENTIFICAREA COCOBACILILOR GRAM-NEGATIVI AEROBI

DUMITRU T. BUIUC

Haemophilus
Bordetella
Brucella
Francisella

Bacili şi cocobacili cu dimensiuni reduse, aceste bacterii sînt reunite în mai multe genuri cu afiliere incertă. Mai frecvent implicate în infecţiile omului sînt speciile de Haemophilus şi de Bordetella. Speciile genurilor Brucella şi Francisella determină zoonoze şi numai accidental infecţii ale omului.

13.1. Genul Haemophilus

Genul Haemophilus reuneşte specii dependente de factori de creştere prezenţi în sînge: factorul X, termostabil (hemina), şi factorul V, termolabil (nicotinamidadenindinucleotidul). Factorul V este furnizat şi de cultura unor bacterii, cum este stafilococul auriu.

13.1.1. Haemophilus influenzae este un comensal frecvent al nazofaringelui implicat, cu precădere la copilul între 2 luni şi 3 ani, în infecţii ale căilor respiratorii (nazofaringite, sinusite, otite medii, epiglotite acute, infecţii bronhopulmonare), conjunctivite şi infecţii sistemice cu localizări secundare (septicemii, meningite, artrite, infecţii ale căilor urinare). La bronşiticii cronici este o cauză frecventă a puseelor de acutizare a bolii.

13.1.1.1. Identificarea microscopică. Bacili fini sau cocobacili de o,2-o,3/o,5-2 µm, gram-negativi. Monomorfi (forme bacilare) în faza logaritmică a culturilor (culturi de 4-6 ore în bulion), polimorfi (forme cocobacilare şi filamentoase) în faza staţionară a culturilor (după 18 ore) şi în unele produse patologice (lichid cefalo-rahidian).

13.1.1.2. Caractere de cultură. Pe geloză-sînge cultura este dis-

Scanned with OKEN Scanner

cretă (geloză cu sînge de cal) sau nu apare de loc (geloză cu sînge de berbec) din cauza insuficienţei factorului V. Pe geloză-sînge coloniile de H.influenzae apar caracteristic satelite celor de stafilococ auriu, care sînt o sursă de factor V (fig.13-1).

Geloza-şocolat este mediul de electie pentru cultivarea acestei bacterii (încălzirea sîngelui la 80°C eliberează în mediu factorii X şi V şi distruge enzimele care inactivează factorul V) Pe geloză-şocolat, după 18 ore de incubare la 37°C, aerob sau în atmosferă îmbogăţită cu CO_2, H.influenzae formează colonii mici, 1-2 mm diametru, transparente.

Identificarea practică a H.influenzae se bazează pe determinarea necesităţilor nutritive (tabelul 13-1).

13.1.1.3. Identificarea antigenică. Reacţii de aglutinare, de precipitare sau de umflare a capsulei cu seruri imune specifice identifică cele 6 tipuri antigenice: a, b, c, d, e, f. Tulpinile invazive, izolate din infecţii sistemice, aparţin serotipului b.

13.1.2. H.haemolyticus, H.parainfluenzae, H.parahaemolyticus sînt comensali ai nasofaringelui, rar cauză a unor infecţii respiratorii. Tot rar, ultimile 2 specii au fost izolate în hemoculturi de la bolnavi cu endocardită subacută.

Diferenţierea hemofililor hemolitici de streptococii β-hemolitici se face pe baza caracterelor microscopice. Identificarea practică a acestor specii de Haemophilus se face pe baza necesităţilor nutritive menţionate în tabelul 13-1.

Tabelul 13-1

Principalele caractere utile pentru identificarea speciilor de Haemophilus izolate din infecţii ale omului

Specia	Cultivarea în				Hemoliză*)	Necesitatea în CO_2	Ser sau alţi factori nutritivi necesari
	Apă peptonată	Apă peptonată cu factor X	Apă peptonată cu factor V	Apă peptonată cu factor X+V			
H.influenzae	-	-	-	+	-	-	-
H.haemolyticus	-	-	-	+	+	-	-
H.parainfluenzae	-	-	+	+	-	-	-
H.parahaemolyticus	-	-	+	+	+	-	-
H.ducreyi	-	+	-	+	±	+	+

*) Pe geloză-sînge

13.1.3. Haemophilus ducreyi, agentul etiologic al şancrului moale, apare la microscop ca un cocobacil gram-negativ colorat bipolar (aspect de suveică) aşezat izolat sau în lanţuri (aspect de lanţ de bicicletă), intra sau extracelular. Cultivarea este dificilă. Pe geloză cu 3o% sînge de iepure, după 48 ore de incubare aerobă cu presiune crescută de CO_2, la 37°C formează colonii mici, S, cenuşii, opace, care alunecă înaintea ansei. Diferenţierea de alte specii de hemofili se face pe baza caracterelor menţionate în tabelul 13-1.

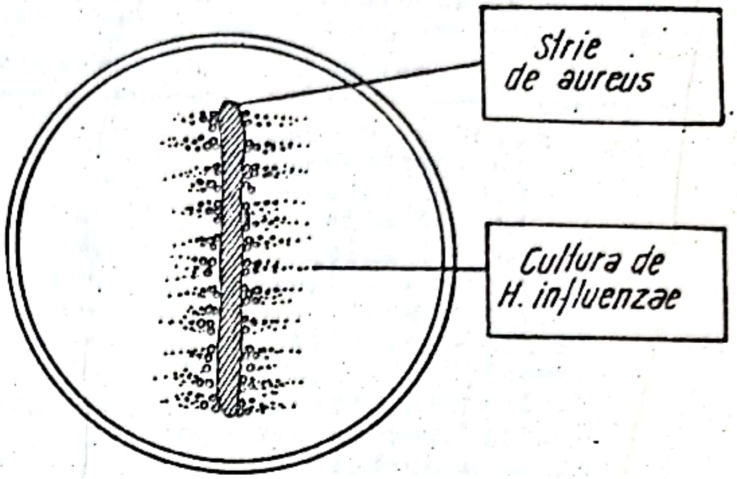


Fig.13-1 Haemophilus influenzae, fenomenul de satelitism faţă de S.aureus

13.1.4. Antibiograma se impune pentru toate tulpinile de Haemophilus cu semnificaţie clinică.

13.2. Genul Bordetella

13.2.1. Bordetella pertussis este agentul etiologic al tusei convulsive. Microscopic, pe frotiul din secreţii bronşice, apare ca un cocobacil gram-negativ, cu tendinţă la colorare bipolară, capsulat, izolat, aşezat în perechi şi ocazional în scurte lanţuri. Cultivă strict aerob şi, la izolarea din organism, numai pe medii complexe. Pe mediul Bordet-Gengou (agar infuzie de cartof, glicerinată, cu 3o% sînge) după 72-96 ore la 37°C formează colonii mici, S, bombate, cu luciu caracteristic de picătură de mercur, înconjurate cu o zonă de hemoliză. In subculturi pierde capsula, se degradează antigenic şi poate cultiva pe medii uzuale. Se diferenţiază de celelalte specii ale genului prin caracterele biochimice şi structura antigenică consemnate în tabelul 13-2.

13.2.2. Bordetella parapertussis şi B.bronchiseptica sînt agenţi etiologici ai unor infecţii respiratorii asemănătoare tusei convulsive dar cu evoluţie mai benignă. Se diferenţiază între ele şi de B.pertussis prin caracterele menţionate în tabelul 13-2.

Tabelul 13-2

Caractere diferenţiale ale speciilor de Bordetella

Caracterul	B.pertussis	B.para-pertussis	B.bronchi-septica
Creşterea pe apă peptonată m.Bordet-Gengou			
în 1-2 zile	-	+	+
în 3-4 zile	+		
Innegrirea mediului	-	+	-
Mobilitate	-	-	+
Nitrat → nitriţi	-	-	+
Ureză	-	+	+
Utilizarea citratului	-	+	+
Aglutinarea cu ser specific adsorbit:			
anti-factor 1	+	-	-
anti-factor 12	-	-	+
anti-factor 14	-	+	-

13.3 Genul Brucella

Principalele specii ale genului Brucella, B.melitensis, B.abortus şi B.suis, sînt agenţii etiologici ai brucelozei, infecţie care afectează caprele, oile, bovinele, porcii ş.a. şi accidental omul.

Microscopic, cel mai frecvent, nu pot fi depistate în probele de la pacienţi. Poate fi depistată însă în acest mod în produse patologice de la animalul bolnav. In frotiurile din culturi apar sub forma unor cocobacili fini, gram-negativi, uneori polimorfi. Cultivă strict aerob în atmosferă cu CO_2. Pe geloză cu infuzie de ficat, la 37°C, brucelele formează după 48-96 ore colonii mici, S, transparente. In primoculturi, adaptarea acestor organisme parazite la mediul artificial poate dura 2-4 săptămîni. Genul Brucella se individualizează prin producerea de ureză şi absenţa fermentării zaharurilor*) Diferenţierea speciilor se face pe baza caracterelor consemnate în tabelul 13-3. Reacţia de aglutinare cu seruri monospecifice permite diferenţierea B.melitensis de B.abortus şi B.suis. Dar nu diferenţiază ultimile 2 specii între ele deoarece conţin, în cantităţi aproximativ egale, un antigen comun.

*) Cantităţile reduse de acizi rezultate din catabolizarea lentă a zaharurilor de către brucele sînt mascate de amoniacul produs prin dezaminarea aminoacizilor.

Tabelul 13-3

Caractere diferenţiale ale principalelor specii de Brucella

Caracterul	B.melitensis	B.abortus	B.suis
Necesitatea CO_2 la izolare	-	+	-
Producerea de H_2S	-	+ numai primele 2 zile	+ timp de 4 zile
Cultivarea în prezenţa			
- fucsină bazică 1:25000	+	+	-
- tionină 1:50000	+	-	+
Aglutinarea cu ser			
- anti-melitensis	+	-	-
- anti-abortus	-	+	+

13.4. Genul Francisella

Francisella tularensis este o bacterie patogenă care în natură infectează mamifere, păsări sălbatice şi artropode hematofage care le parazitează şi numai accidental omul.

Microscopic apare ca un mic cocobacil, 0,2/0,2-0,7 µm, gram-negativ foarte polimorf. Cultivă numai în aerobioză şi pe medii îmbogăţite (agar-sînge-glucoză-cistină ş.a.) formînd după 2-5 zile la 37°C colonii cenuşii, frecvent α-hemolitice. Soarecii inoculaţi*) cu produse patologice de la bolnav fac o infecţie septicemică mortală în 3-6 zile. La necropsie se observă, cu lupa, pe suprafaţa ficatului şi splinei noduli necrotici. Frotiurile din ficat, splină şi sînge colorate Giemsa evidenţiază foarte numeroşi cocobacili. Din sîngele cardiac al şoarecilor infectaţi experimental, F.tularensis se izolează mai uşor pe medii de cultură artificiale decît din produse patologice de la bolnav. Identificarea izolaţilor se face pe baza spectrului de fermentare a zaharurilor (F.tularensis fermentează fără gaz glucoza, maltoza şi manoza) şi prin aglutinare pe lamă cu ser specific.

BIBLIOGRAFIE

Brinley-Morgan W.J., Mc Culough N.B. (1975): Genus Brucella. In BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology, ediţia VIII-a, The Williams & Wilkins Company, Baltimore, pp.278-282.

Owen C.R. (1975): Genus Francisella. Opera citată pp.283-285.

Pittman M. (1975): Genus Bordetella. Opera citată pp.282-283.

Zinnemann K., Biberstein E.L. (1975): Genus Haemophilus. Opera citată pp.364-368.

Scanned with OKEN Scanner

14. IDENTIFICAREA BACILILOR GRAM-POZITIVI AEROBI NESPORULATI

MARIANA N. LUCA

Corynebacterium
Listeria
Erysipelothrix

14.1. Genul Corynebacterium

Corynebacterium diphtheriae, agentul etiologic al toxiinfecţiei difterice, trebuie diferenţiat de bacilii difterimorfi (C.pseudodiphthericum, C.xerosis ş.a.) care habitează mucoasa căilor respiratorii superioare, mucoasa genitală şi conductul auditiv extern.

14.1.1. Identificarea microscopică

C.diphtheriae apare cu morfologia caracteristică numai pe frotiurile din produs patologic (falsa membrană) sau din cultura pe mediul Löffler. Frotiul Gram evidenţiază bacili drepţi sau uşor încurbaţi, inegal calibraţi, cu extremităţile măciucate, dispuşi în formă de V, în palisade sau sub forma literelor chinezeşti.

Gram-pozitivi la limită, după o decolorare mai prelungită, bacilii difterici apar granulari, granulaţii violete dispuse predominant polar pe fondul roşu al bacililor. Aceste granulaţii sînt numite corpusculi Babeş-Ernst (după autorii care le-au descris) sau corpusculi metacromatici (după comportamentul lor în colorаţii speciale: se colorează metacromatic în roşu cu albastru de metilen Löffler sau în albastru-brun prin coloraţia Neisser).

Cultivat pe alte medii, în special pe cele selective cu telurit de potasiu, bacilul difteric pierde morfologia caracteristică.

Unii bacili difterimorfi se diferenţiază uşor microscopic de bacilii difterici prin aspectul lor scurt, gros, în suveică, lipsa corpusculilor metacromatici (C.pseudodiphthericum), alţii sînt însă greu de diferenţiat.

14.1.2. Caractere de cultură

Cultivarea bacilului difteric este favorizată pe medii cu

ser sau cu sînge.

Pe mediul Löffler (bulion glucozat cu ser de bou coagulat în pantă) bacilul difteric formează, după 12-18 ore de incubare aerobă la 37°C, colonii mici, albe, ușor granulare, de consistență untoasă. Pe mediile de izolare cu telurit de potasiu bacilul difteric cultivă după 24-48 ore:

- pe mediul Tinsdale (agar cisteină-telurit de potasiu) formează colonii mici cenușiu-închis, înconjurate cu un halou brun net delimitat;

- pe mediul Gundel-Tietz (geloză-sînge cu telurit de potasiu) formează colonii negre cu aspect caracteristic ce permite diferențierea celor 3 tipuri de bacili difterici: gravis, mitis și intermedius (tabelul 14-1).

Bacilii difterimorfi formează pe mediul Löffler colonii albcenușii iar pe mediile cu telurit de potasiu colonii cenușii sau negre, lipsite de haloul brun caracteristic pe mediul Tinsdale.

14.1.3. Identificarea biochimică

Nici unul din caracterele microscopice sau de cultură apreciate separat nu individualizează cert bacilii difterici. Considerate însă în ansamblul lor permit o identificare preliminară, orientativă. Studiul caracterelor biochimice consemnate în tabelul 14-1 este cel care permite diferențierea certă a C.diphtheriae de speciile difterimorfe ca și identificarea tipului de bacil difteric.

14.1.4. Testarea toxigenezei trebuie să finalizeze identificarea bacililor difterici.

Testul i n v i t r o, testul Elek (→ 5.2.1.1.2.1.)

Testul i n v i v o : se folosesc 2 cobai în greutate de 300-400 g fiecare. Unul din ei, martorul, este imunizat prin injectarea intraperitoneală a 250 unități de ser antidifteric. După 2 ore ambii cobai se inoculează subcutanat în regiunea abdominală cu cîte 4 ml din cultura de 48 ore în bulion a tulpinii de testat. Dacă tulpina de C.diphtheriae este toxigenă, cobaiul neprotejat cu ser antidifteric decedează în curs de 24-96 ore cu fenomene generale și locale de intoxicație difterică: edem gelatinos la locul inoculării, exsudat sero-sangvinolent pleural și peritoneal, hemoragii în capsulele suprarenale. Dacă ambii cobai nu manifestă semne de boală, tulpina testată poate fi C.diphtheriae netoxigen, iar dacă ambii cobai prezintă fenomene de boală, tulpina testată nu este C.diphtheriae. În cazul unei tulpini slab toxigene (inocu-

Tabelul 14-1

Caractere diferenţiale pentru bacilul difteric şi bacilii difterimorfi

Specia	Morfologia	Aspectul coloniilor pe geloză-sînge cu telurit de potasiu	Hemoliză	Amidon	Glucoză	Maltoză	Zaharoză	Urează	Toxigeneză
C.diphtheriae tip gravis	Scurţi, coloraţi uniform	Colonii R, mari, cenuşiu închis negre, turtite, margini crenelate, suprafaţa striată radiar, aspect de „floare de margaretă"	-	+	+	+	-	-	+
C.diphtheriae tip mitis	Lungi cu multe granulaţii metacromatice	Colonii S, mijlocii, negre, netede, lucioase, bombate	+	-	+	+	-	-	+
C.diphtheriae tip intermedius	Lungi cu sapete măsiucate şi granulaţii metacromatice	Colonii cenuşii cu centru negru, acuminate, uşor rugoase, cu margini regulate	-	-	+	+	-	-	+
C.pseudodiphtherieum	Scurţi, în palisade, coloraţi uniform	Colonii mici, cenuşii cu centrul mai închis, lucioase	-	-	-	-	-	+	-
C.xerosis	Lungi, asemănători b.difterie	Colonii mici, negre, lucioase	-	-	+	+	+	-	-

larea unei cantităţi mai mici decît o doză limită letală) cobaiul test slăbeşte progresiv, poate prezenta o escară la locul de inoculare şi la 15-2o zile după inoculare prezintă paralizii.

14.2. Listeria monocytogenes

L.monocytogenes este agentul etiologic al unei zooantroponoze recunoscută din ce în ce mai frecvent la om.

14.2.1. Identificarea microscopică

Frotiul Gram din produs patologic (l.c.r. în formele meningoencefalitice ale infecţiei; lochii, placentă în infecţiile intrauterine urmate de avort sau naştere de făt mort; amprente de creier, ficat, splină în infecţiile letale) depistează un bacil fin, gram-pozitiv, izolat sau în scurte lanţuri, intra- sau extracelular.

14.2.2. Caractere de cultură

Bacterie facultativ anaerobă, L.monocytogenes se dezvoltă pe medii uzuale. Pe geloză sînge, după 24 ore la 37°C, formează colonii relativ mici, S, cenuşiu-albăstrui, înconjurate, după 48 ore, cu o zonă discretă de beta-hemoliză.

Capacitatea L.monocytogenes de a cultiva la 4°C este folosită ca procedeu de îmbogăţire a acestei bacterii în produse patologice.

Cultivată la 22-26°C L.monocytogenes apare mobilă (examen între lamă şi lamelă sau însămînţare în coloană de geloză moale).

14.2.3. Caractere de patogenitate

Iepurii inoculaţi intraconjunctival cu cultura de 24 ore, proaspăt izolată, fac o cheratoconjunctivită purulentă (testul Anton). Unele animale se vindecă după 6-7 zile, altele fac o meningoencefalită mortală.

Identificarea definitivă a L.monocytogenes se face pe baza caracterelor biochimice (posedă catalază, hidrolizează rapid esculina, nu produce urează şi nici H_2S) şi a structurii antigenice.

BIBLIOGRAFIE

Calalb G. (1967): Difteria, Editura Medicală, Bucureşti.

Duca E. (1979): Genul Corynebacterium. In Microbiologie Medicală, Duca E., Duca M., Furtunescu G. (editori), Editura didactică şi pedagogică, Bucureşti.

Hermann G.J., Bickman S.T. (1974): Corynebacterium. In Manual of Clinical Microbiology, Lennette E.H., Spaulding E.H., Truant J.P. (editori), American Society of Microbiology, Washington.

Gray M.L., Killinger H.H. (1966): Listeria monocytogenes and listeric infections. Bact.Rev., 30:309.

15. IDENTIFICAREA BACILILOR GRAM-POZITIVI SPORULATI

GABRIELA C. COMAN

Bacillus
Clostridium

Bacilii gram-pozitivi sporulaţi sînt încadraţi în familia Bacillaceae, cu două genuri de interes medical: Bacillus şi Clostridium .

15.1. Genul Bacillus

Include specii aerobe şi facultativ anaerobe care sporulează exclusiv în aerobioză (caracter diferenţial faţă de clostridiile aerotolerante). Majoritatea sînt saprofite cu largă răspîndire în natură, unele prezente pe mucoase la om.

B.anthracis, singura specie înalt patogenă, determină infecţii naturale cu evoluţie mortală la erbivore. Omul se poate îmbolnăvi accidental prin contact cu animale bolnave sau produse contaminate provenite de la acestea. Pustula malignă este cea mai frecventă formă de manifestare a infecţiei şi apare la nivelul tegumentelor expuse contaminării (mîini, faţă ş.a.). Formele pulmonare sau digestive ale infecţiei cărbunoase sînt mai rare, dar de gravitate extremă. Toate formele infecţiei cărbunoase pot evolua septicemic cu localizări secundare meningoencefalice. Măsurile specifice şi nespecifice de profilaxie au făcut ca în prezent incidenţa infecţiei cărbunoase la animale şi corespunzător la om să fie scăzută.

B.cereus poate determina toxiinfecţii alimentare, iar B.subtilis infecţii oculare severe. Specii de Bacillus pot determina bacteriemii şi localizări secundare la organisme cu apărarea antiinfecţioasă compromisă.

15.1.1. Identificarea microscopică

Frotiul colorat Gram din produse patologice (exsudat de la nivelul leziunii cutanate, spută, l.c.r., sînge) poate depista

bacili mari, gram-pozitivi, cu extremităţile tăiate drept, izolaţi, în perechi sau în scurte lanţuri, capsulaţi. Uneori capsula devine vizibilă numai prin coloraţia cu albastru de metilen Loeffler: se colorează metacromatic în roz.

Pe frotiuri din cultură bacilii se dispun predominant în lanţuri şi apare evident sporul ovoid, dispus central sau paracentral, fără să deformeze semnificativ forma bacilului. Capsula poate fi sintetizată şi i n v i t r o pe medii bogate în substanţe proteice şi incubate în atmosferă cu CO_2.

Caractere microscopice asemănătoare pot fi întîlnite la unii membri ai genului cunoscuţi sub numele de antracoizi.

15.1.2. Caractere de cultură

B.anthracis cultivă atît aerob cît şi anaerob, pe medii simple la 37°C, în interval de 18-24 ore. Unele specii de Bacillus sînt strict aerobe (schema 15-1).

Coloniile de B.anthracis sînt mari, cu margini neregulate, opace, uscate şi mate (tip R). Pe geloză sînge sînt nehemolitice, spre deosebire de cele ale bacililor antracoizi care formează colonii înconjurate cu o zonă largă de hemoliză clară. Coloniile formate din bacili capsulaţi (incubare în atmosferă cu 3-5% CO_2) sînt de tip S.

Însămînţarea prin înţepare în coloană de geloză moale evidenţiază caracterul imobil pentru B.anthracis; bacilii antracoizi sînt mobili.

15.1.3. Identificarea biochimică. O serie de teste biochimice sînt folosite pentru identificarea speciilor de Bacillus. Astfel, fermentarea salicinei, testul lecitinazei, lichefierea gelatinei, reducerea albastrului de metilen diferenţiază B.anthracis de bacilii antracoizi, fiind negative pentru această specie.

15.1.4. Identificarea antigenică

Seruri specifice fluorescente pot servi la identificarea antigenelor capsulare ale B.anthracis pe frotiuri din prose patologice sau cultură. Extractul apos obţinut la cald din produse provenite de la animale moarte prin infecţie cărbunoasă (măduvă osoasă, splină) dau o reacţie de precipitare inelară în prezenţa serului antisărbunos (testul Ascoli).

15.1.5. Patogenitatea experimentală

Caracterul diferenţial major între B.anthracis şi bacilii antracoizi este patogenitatea pentru animalele de laborator. La şoarece, animalul de elecţie, B.anthracis determină, după inoculare intraperitoneală sau subcutanată, o infecţie septicemică, mortală în 2-5 zile. B.anthracis poate fi depistat în amprente din organe (splină, ficat) sau în sîngele (frotiu, hemocultură) animalelor inoculate.

15.1.6. Antibiograma. Nu s-a semnalat antibiorezistenţă dobîndită natural a tulpinilor de B.anthracis. Testarea sensibilităţii la penicilină este uzuală pentru identificare: B.cereus este natural rezistent la penicilină (10 UI/ml), în timp ce B.anthracis este sensibil.

15.2. Genul Clostridium

Reuneşte bacili gram-pozitivi sporulaţi anaerobi larg răspîndiţi în natură, în special în sol (bacterii telurice), unii prezenţi în conţinutul intestinal la om şi animale. Dintre numeroasele specii prezintă interes medical:

- C.tetani, care determină toxiinfecţia tetanică;
- C.botulinum, care determină intoxicaţia botulinică;
- C.perfringens, C.novyi (oedematiens), C.septicum, C.histolyticum, C.sordellii, C.sporogenes ş.a. care, în variate asociaţii (inclusiv cu specii aerobe), determină infecţii histotoxice (gangrena gazoasă, celulita clostridiană, sindromul gangrenos postabortum sau postpartum, sindromul gangrenos postoperator); C.perfringens poate fi cauza unor toxiinfecţii alimentare;
- C.difficile, considerat responsabil de apariţia colitei din cursul sau după tratamentul cu unele antibiotice (mai ales clindamicină, lincomicină, ampicilină).

Laboratorul de microbiologie clinică poate fi confruntat mai ales cu identificarea speciilor Clostridium responsabile de manifestări de tip gangrenos. Diagnosticul de toxiinfecţie tetanică se stabileşte pe baza tabloului clinic deosebit de caracteristic. In intoxicaţia botulinică se urmăreşte exclusiv identificarea toxinei în produse de la bolnav (conţinut gastric, intestinal, sînge) şi în aliment. Implicarea C.difficile în colita postantibiotică se realizează prin depistarea şi identificarea enterotoxinei

Scanned with OKEN Scanner

15.2.

prin inocularea filtratului de materii fecale pe culturi de celule.

15.2.1. Identificarea microscopică

In infecţii de tip gangrenos frotiul Gram din produse patologice (serozitatea din profunzimea plăgilor, secreţii uterine, lichid peritoneal) evidenţiază bacili gram-pozitivi cu extremităţi rotunjite, unii sporulaţi. Sporul este ovalar, dispus subterminal sau central şi depăşeşte diametrul transversal al bacilului (planşa VI, fig.11). C.perfringens poate fi recunoscut după prezenţa capsulei. Frotiul din cultură nu permite în general diferenţieri între clostridiile gangrenei gazoase.

In plăgi tetanigene, C.tetani nu poate fi pus în evidenţă prin examen microscopic direct. Frotiul din cultură arată bacili lungi şi subţiri, gram-pozitivi în culturi tinere (gram-negativi în culturi mai vechi şi după sporulare). Sporul este sferic, dispus terminal (aspect de ac cu gămălie) (planşa VI, fig.12).

15.2.2. Caractere de cultură

Clostridiile cultivă numai în condiţii de anaerobioză la temperatura optimă de 37°C în interval de 24 ore. Bulionul VF este tulburat intens cu degajare de bule de gaz şi miros dezagreabil. In geloză moale coloniile sînt pufoase, unele invadante. C.perfringens, singura specie imobilă, şi variantele aciliate ale speciilor mobile formează colonii lenticulare. Aspectul coloniilor pe geloză cu 5% sînge de berbec este variabil, majoritatea speciilor fiind hemolitice. C.perfringens formează o zonă dublă de hemoliză: una clară imediat în jurul coloniei, cealaltă, incompletă, la periferie.

15.2.3. Identificarea biochimică

Insămînţarea pe mediul Willis-Hobbs (agar-lactoză-gălbenuş de ou-lapte-roşu neutru) neselectiv sau selectiv (cu streptomicină, neomicină, polimixină) serveşte atît la izolarea clostridiilor din produse patologice cît şi la identificarea lor preliminară prin punerea în evidenţă a unor caractere biochimice: fermentarea lactozei (colonii roşii), producerea de lecitinază (opalescenţă în jurul coloniei), lipază (strat perlat), enzime proteolitice (zonă transparentă în jurul coloniei) (schema 15-1).

15.2.4. Identificarea antigenică

Identificarea antigenică a exotoxinei sau a unor exoenzime

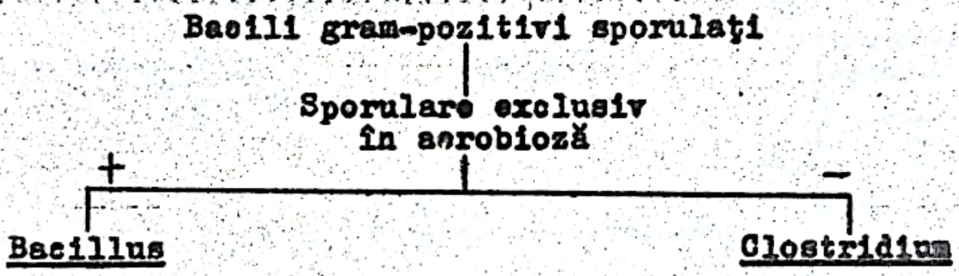
elaborate reprezintă testul major de identificare.

C.perfringens ca şi alte specii producătoare de lecitinaze (schema 15-1b) pot fi uşor identificate pe mediul Nagler (cu gălbenuş de ou) sau Willis-Hobbs folosind neutralizarea prin ser specific a efectului acestor lecitinaze.

Pentru identificarea toxinei tetanice, a tipurilor de toxină botulinică sau a toxinelor elaborate de C.perfringens sau alte clostridii ale gangrenei gazoase se recurge la testul de seroneutralizare pe şoarece

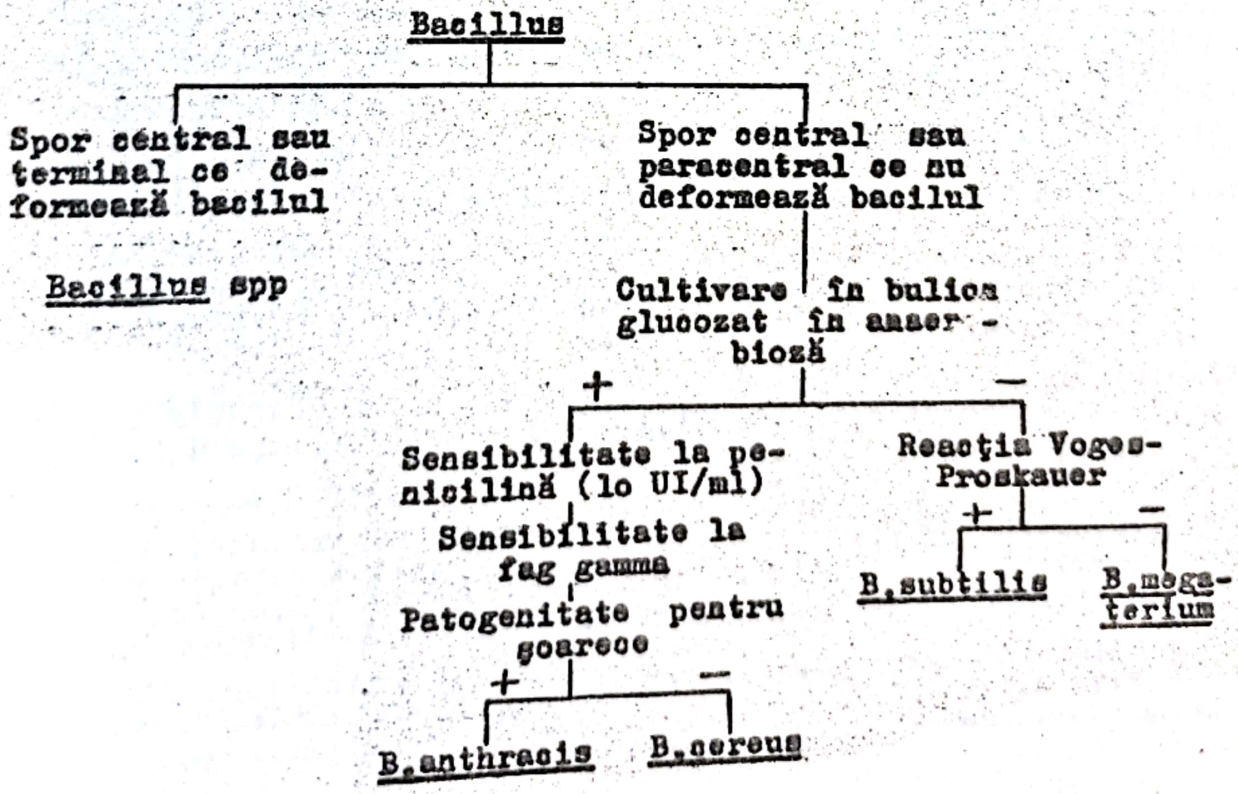
Schema 15-1

Algoritmul identificării bacililor gram-pozitivi sporulaţi



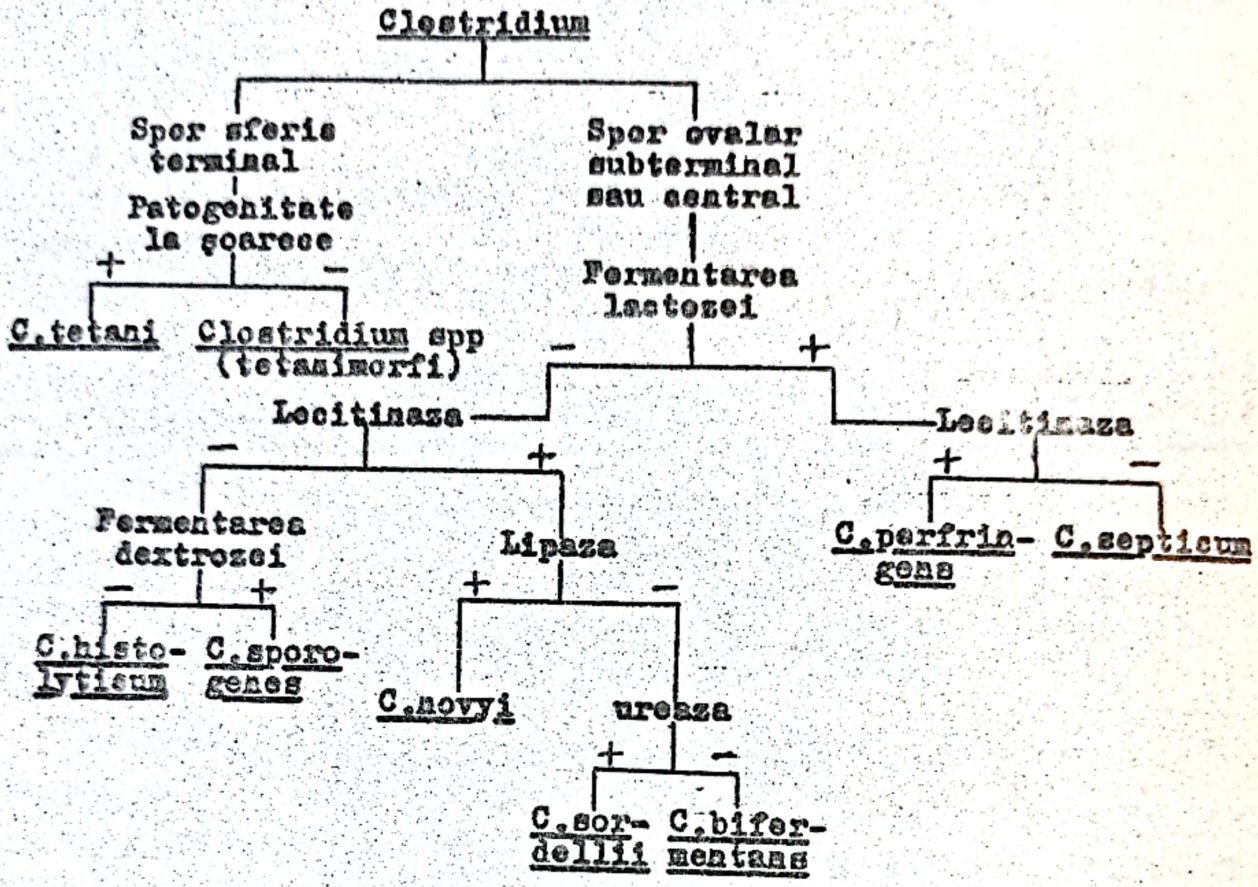
Schema 15-1a

Algoritmul identificării speciilor de Bacillus



Schema 15-1b

Algoritmul identificării clostridiilor



BIBLIOGRAFIE

Bittner J. (1981): Metode recomandate pentru diagnosticul de laborator al infecțiilor anaerobe. Bios nr. 1-2: 3-25.

Gibson T., Gordon R.E. (1975): Genus Bacillus. In BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology, ediția VIII-a, The Williams & Wilkins Company, Baltimore, pp.529-55o.

Javetz E., Melnick J.L., Adelberg E.A. (198o): Review of medical microbiology, ediția 14-a, Large Medical Publications, pp. 2o8-214.

Smith L., Hobbs G. (1975): Genus Clostridium. In BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology, ediția VIII-a, The Williams & Wilkins Company, Baltimore, pp.551-572.

Wolf J., Barker A.N. (1968): The genus Bacillus: aids to the identification of its species. In Identification methods for microbiologists. Part B. Gibbs B.M., Shapton D.H. (editori), Academic Press, New York, pp.93-1o8.

x x x Clostridia as intestinal pathogens (editorial). Lancet, 1977, 2:1113-1114.

16. IDENTIFICAREA BACTERIILOR ANAEROBE NESPORULATE

GABRIELA C. COMAN

Coci gram-pozitivi
- în grămezi: Peptococcus
- în lanţuri: Peptostreptococcus

Diplococi gram-negativi: Veillonella

Bacili gram-pozitivi
- ramificaţi : Bifidibacterium, Actinomyces.)
- neramificaţi: Eubacterium, Propionibacterium.), Lactobacillus.)

Bacili gram-negativ: Bacteroides, Fusobacterium

Spirili: Campylobacter

Spirochete: Treponema

Bacteriile anaerobe nesporulate fac parte din microbiota indigenă a oro-faringelui, intestinului, vaginului, uretrei şi tegumentelor. În ansamblul lor aceste bacterii mai sînt cunoscute şi sub numele de flora Veillon. Unele specii sînt comensale nepatogene (Bifidibacterium, Lactobacillus). Altele îşi manifestă potenţialul patogen în asociaţii pluribacteriene cu participarea unor specii aerobe, facultativ anaerobe sau anaerobe, pe fondul unei alterări a capacităţilor antiinfecţioase ale gazdei (soluţii de continuitate a învelişurilor, carenţe alimentare ş.a.) Frecvent, în infecţii cu punct de plecare digestiv sau genital este prezent Bacteroides fragilis, bacil gram-negativ capsulat, particular rezistent la penicilină.

Identificarea ca specie sau gen a anaerobilor nesporulaţi este deosebit de dificilă întrucît necesită numeroase teste, unele accesibile numai laboratoarelor de referinţă. Laboratorul de microbiologie clinică îşi propune să cerceteze prezenţa acestor bacterii în produsele patologice examinate (în exclusivitate provenite din zone normal sterile, evitînd la maximum contaminarea cu microbiota învelişurilor), să le încadreze într-unul din grupurile morfotinctoriale şi să stabilească spectrul de sensibilitate la antibiotice.

.) Cuprind specii preferenţial anaerobe, unele facultativ anaerobe.

16.1. Identificarea microscopică. Apartenenţa speciilor anaerobe nesporulate la aceleaşi categorii microscopice cu speciile aerobe sau facultativ anaerobe face în general dificilă diferenţierea lor microscopică. Totuşi, aspecte mai particulare ale unor anaerobi (cocci de dimensiuni mai mici, bacilii gram-negativi deosebit de polimorfi, bacilii gram-positivi cu ramificaţii) permit suspectarea acestora în produsul examinat.

Actinomyces israelii, agentul etiologic al actinomicozei, poate fi uşor identificat prin examenul microscopic al „granulelor de sulf" din puroi. Aceste granule gălbui, cu diametrul de 0,2-1 mm, sînt colonii de Actinomyces dezvoltate în ţesuturi. Pe frotiul Gram, realizat prin strivirea între 2 lame de microscop a unui asemenea granul, apare o masă de filamente pseudomiceliene gram-pozitive agregate în zona centrală, cu ramificaţii periferice măciucate şi gram-negative. Dacă frotiul se efectuează prin etalare cu ansa, pseudomiceliile se dispersează în forme bacilare diferimorfe dificil de identificat corect.

16.2. Caractere de cultură. Flora Veillon cultivă exclusiv în anaerobioză; CO_2 în concentraţie de 3-5% favorizează cultivarea. Pe geloză sînge, după 24-72 ore la 37°C, coloniile sînt S, translucide sau semiopace, eventual înconjurate de o zonă de hemoliză; unele, deosebit de mici, necesită examinare şi repicare sub lupă.

Bacteroides melaninogenicus formează colonii pigmentate în brun-negru pe medii cu sînge lacat, hemină şi vitamina K. B.fragilis este stimulat caracteristic în dezvoltare pe medii cu 20% bilă, nefiind afectat de prezenţa unor concentraţii mari de kanamicină (1000 µg/ml).

16.3. Identificarea biochimică se realizează numai în laboratoare de referinţă recurgînd la numeroase teste biochimice şi la analiza cromatografică a produşilor rezultaţi din fermentarea glucozei.

16.4. Antibiograma. Sensibilitatea la antibiotice a florei Veillon poate varia în raport cu specia (servind drept criteriu de identificare) şi chiar de la tulpină la tulpină (mai ales în cazul bacililor gram-negativi). Aceasta impune efectuarea antibiogramei. Testarea se face faţă de peniciline, eritromicină, cefalosporine, cloramfenicol, tetracicline, rifampicină, clindamicină, lincomicină şi metronidazol. Flora Veillon este rezistentă la aminoglicozide.

17. IDENTIFICAREA BACILILOR ACIDO-ALCOOLO-REZISTENTI

VIORICA I. PETREANU

Mycobacterium

Cu importanţă pentru laboratorul clinic, dintre numeroasele specii ale genului Mycobacterium reţinem

(i) specii patogene

- agenţii etiologici ai tuberculozei:
  - M.tuberculosis
  - M.bovis
  - M.africanum
- agentul etiologic al leprei:
  - M.leprae

(ii) specii condiţionat sau accidental patogene (numite generic mycobacterii atipice), agenţi etiologici ai unor infecţii asemănătoare tuberculozei şi reunite sub denumirea de micobacterioze:

- M.kansasii
- M.avium-intracellulare
- M.scrofulaceum
- M.marinum
- M.fortuitum ş.a.

(iii) specii nepatogene, saprofite ale mediului extern, găzduite uneori pe mucoasele genito-urinare sau în cavitatea gastrică, contaminanţi ocazionali ai produselor patologice în care cercetăm prezenţa bacililor tuberculozei:

- M.smegmatis
- M.gastri
- M.terrae ş.a.

17.1. Identificarea microscopică. Pe frotiuri efectuate din produse patologice şi colorate Ziehl-Neelsen (⟶ 2.2.2.2.2.) mycobacteriile apar ca bacili roşii, subţiri, drepţi sau uşor încurbaţi, de lungimi variabile (1-1o/o,2-o,6 µm), dispuşi izolaţi sau grupaţi cîte 2-3 sub formă le litere unghiulare (forme ramificate).

Prin culoarea lor roşie strălucitoare se diferenţiază uşor de flora microbiană neacido-alcoolo-rezistentă şi de elementele celulare din produs care se colorează în albastru. Examenul microscopic nu diferenţiază între speciile patogene sau sapro-

fite ale genului Mycobacterium. De aceea reţinem numai categoria microscopică de bacili acido-alcoolo-rezistenţi sau mycobacterii.

M.leprae este identificat microscopic în secţiuni de ţesut sau frotiuri, în special din leziuni lepromatoase, prin dispunerea caracteristică a bacililor acido-alcoolo-rezistenţi intracelular, în citoplasma macrofagelor, în mănunchiuri paralele numite „globi"

Identificarea speciilor de mycobacterii se face pe baza caracterelor de cultură, biochimice, a patogenităţii experimentale şi este de competenţa laboratoarelor de referinţă. In laboratorul clinic se realizează diferenţierea M.tuberculosis şi M.bovis de mycobacteriile atipice şi saprofite (schema 17-1) pentru a stabili

- semnificaţia clinică a unei mycobacterii prezente în produse patologice contaminate (→ 31.) ;
- conduita terapeutică a mycobacteriozelor, mycobacteriile atipice fiind natural rezistente la unele tuberculostatice (HIN, streptomicină ş.a.)

17.2. Caracterele de cultură. Mycobacteriile, organisme aerobe, curent sînt cultivate pe mediul Löwenstein-Jensen[1]. Se studiază capacitatea de a cultiva i n v i t r o , temperatura optimă de cultivare, intervalul în care apare cultura, pigmentogeneza, capacitatea de a forma cordi.

M.leprae nu cultivă i n v i t r o[2].

Bacilii tuberculozei (M.tuberculosis, M.bovis, M.africanum), ca şi majoritatea mycobacteriilor condiţionat patogene, cultivă optim la 37°C caracterizîndu-se printr-o creştere lentă în 2-3 săptămîni, dezvoltarea culturilor trebuind urmărită pînă la 2-3 luni cînd se poate afirma un rezultat definitiv.

Unele mycobacterii atipice şi saprofite cresc la temperaturi optime sub sau peste 37°C şi în intervale de timp mai mici de 7

1) Mediu complex pe bază de ou cu glicerină, asparagină, feculă de cartof, săruri minerale, verde malachit; solidificat în pantă prin coagulare pe baie de nisip, 45 minute la 85°C.

2) M.leprae a fost izolat recent din leziuni nodulare cutanate pe un mediu difazic complex (mediul lichid J-4 şi solid T-19) avînd ca factori de creştere omogenat de nerv periferic de şobolan, acetilcolină şi noradrenalină, cunoscută fiind afinitatea M.leprae pentru acest substrat.

zile (de exemplu, M.fortuitum, M.smegmatis).

Aspectul culturii. Pe mediul Löwenstein-Jensen M.tuberculosis cultivă eugonic formînd colonii R, proeminente, nepigmentate, uşor detaşabile de pe suprafaţa mediului, adesoori cu aspect conopidiform. M.bovis cultivă disgonic formînd colonii S, mici, nepigmentate, aderente la suprafaţa mediului. Aspectul culturii mycobacteriilor atipice este diferit: S sau R, nepigmentate sau pigmentate la întunerie (scotocromogene) sau numai după expunerea la lumină (fotocromogene).

Dispoziţia în corzi. Examenul microscopic al frotiului din colonii evidenţiază bacili acido-alcoolo-rezistenţi cu dispoziţie paralelă, în corzi sau în grămezi, pentru M.tuberculosis şi M.bovis şi bacili dispersaţi uniform sau în grupuri mici cu mulţi bacili izolaţi pentru celelalte mycobacterii

17.3. Identificarea biochimică

Testul niacinei (Konno) este pozitiv la tulpinile de M.tuberculosis (produc acid nicotinic în cantitate mare) şi negativ la M.bovis şi mycobacteriile atipice.

Tehnica. In eprubeta cu cultura de testat se adaugă 1 ml apă distilată sterilă. Se încălzeşte eprubeta uşor, ţinînd-o cu apa spre flacără (fără să fiarbă), şi se lasă 10-15 minute pe masa de lucru. In o,5 ml apă care a extras acidul nicotinic se adaugă o,1 ml soluţie 4% anilină în alcool etilic de 96°, preparată extemporaneu. Sub nişă, se adaugă 3-4 picături din soluţia 10% bromură de cianogen. Apariţia culorii galbene indică o reacţie pozitivă.

Testul inactivării catalazei. M.tuberculosis şi M.bovis pierd catalaza prin încălzire la 70°C în timp ce mycobacteriile atipice se caracterizează printr-o catalază termorezistentă; de menţionat că tulpinile de M.tuberculosis şi M.bovis care au dobîndit rezistenţă înaltă la HIN ($>$ 10 μg/ml) sînt catalazo-negative.

Tehnica. In 2 tuburi de hemoliză se pun cîte o,5 ml dintr-o soluţie apoasă 10% de Tween 80. Cîte o ansă din cultura de cercetat se omogenizează în fiecare tub. Un tub se încălzeşte 15 minute la 70°C în baie de apă. Se adaugă apoi în ambele tuburi cîte o,5 ml apă oxigenată. Prezenţa enzimei se traduce prin apariţia a numeroase bule de gaz = test pozitiv.

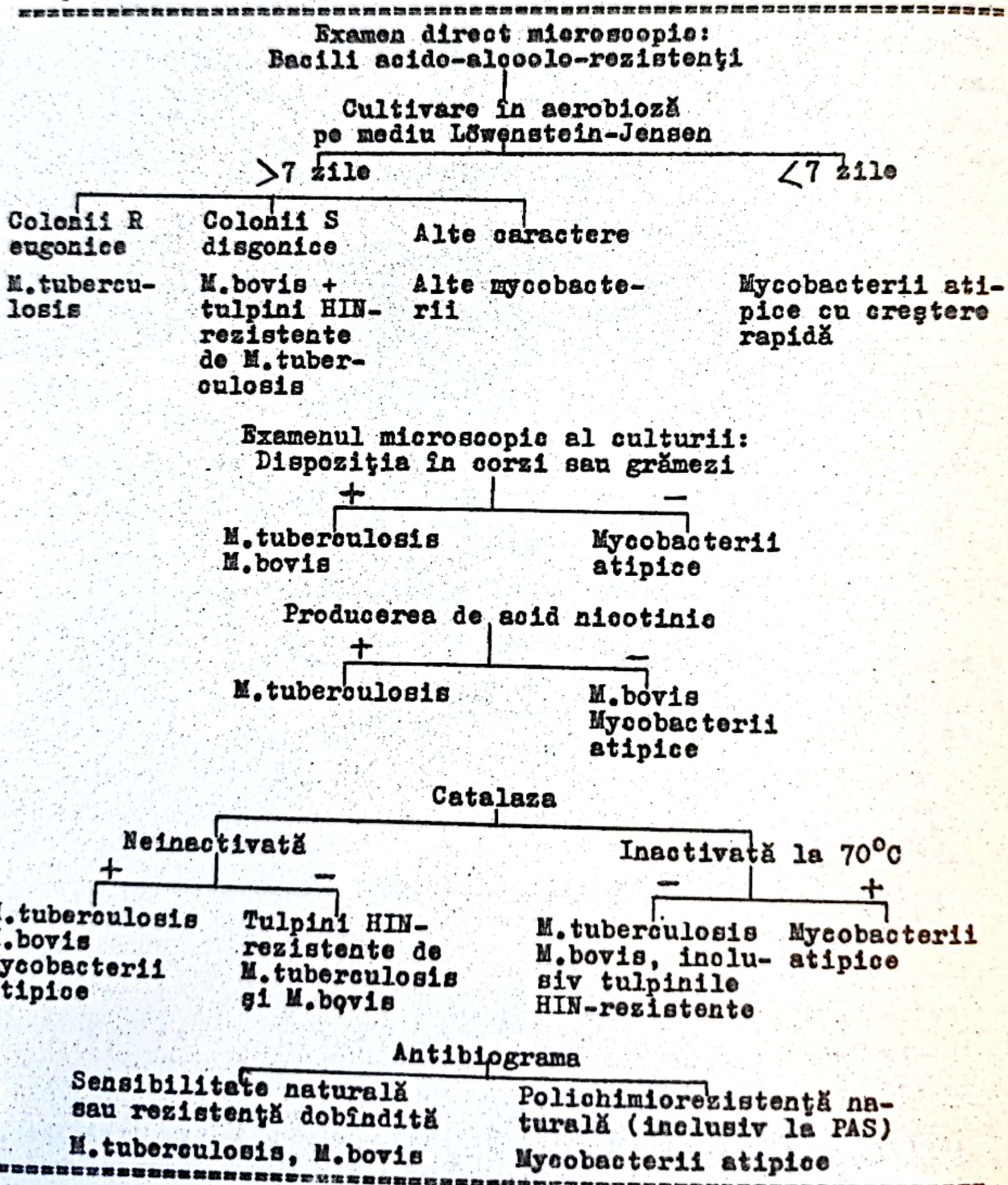
17.4. Rolul antibiogramei în identificarea mycobacteriilor. Mycobacteriile pot prezenta chimiorezistenţă naturală sau dobîndită la tuberculostatice. La bacilii tuberculozei chimirezistenţa este dobîndită şi, aşa cum am văzut, se poate însoţi de modificări ale unor caractere de cultură şi biochimice. La mycobacteriile atipice chimiorezistenţa este naturală şi multiplă. De aceste aspecte

trebuie să se ţină cont la identificarea mycobacteriilor.

I n c o n c l u z i e, diferenţierea bacililor tuberculozei de mycobacteriile atipice se realizează prin coroborarea rezultatelor mai multor teste efectuate la apariţia primoculturii (aspectul macro- şi microscopic al coloniilor) şi odată cu citirea antibiogramei (testul Konno, testul catalazei).

Schema 17-1

Etapele de identificare a bacililor tuberculozei



18. IDENTIFICAREA SPIROCHETELOR

MARIANA N. LUCA

Treponema
Borrelia
Leptospira

18.1. Genul Treponema

Cele trei specii de Treponema patogene, T.pallidum, agentul etiologic al sifilisului, T.pertenue, agentul etiologic al pianului, şi T.carateum, agentul etiologic al pintei, sînt necultivabile. De aceea identificarea lor se face numai microscopic. In probe de produs patologic (serozitatea din şanerul de inoculare în sifilis şi pian, din crevasele cutanate în pinta) examinate între lamă şi lamelă la microscopul cu fond negru, treponemele apar ca microorganisme filamentoase de 6-20 μm lungime, subţiri, cu 4-14 spire adînci, regulate şi cu capetele efilate (fig.2-13). Sînt animate de mişcări graţioase de flexie şi de translaţie lentă. Diferenţierea treponemelor patogene de cele saprofite de contaminare a leziunilor genitale, bucale sau cutanate este uneori dificilă. Comparativ cu T.pallidum, treponemele saprofite sînt mai lungi, mai groase şi cu spire mai neregulate. Singura metodă microscopică de diferenţiere certă a treponemelor patogene, coloraţia imunofluorescentă directă, rămîne încă la dispoziţia unui număr redus de laboratoare de cercetare.

18.2. Genul Borrelia

Unele specii sînt patogene pentru om şi animale la care determină febrele recurente transmise prin păduche (B.recurrentis ş.a.) sau căpuşe (B.duttoni ş.a.)

18.2.1. Identificarea microscopică. Borreliile pot fi depistate microscopic în sîngele recoltat de la bolnav în cursul acceselor febrile ale bolii. Frotiul din sînge colorat Giemsa, metoda de elecţie, evidenţiază microorganisme filamentoase de 10-20 μm lungime, subţiri, cu 5-7 spire largi, neregulate (fig.2-13). Examenul plasmei între lamă şi lamelă la microscopul cu fond negru de-

pisteazã în plus mobilitatea germenului.

18.2.2. Caractere de culturã. Borreliile cultivã în 7-9 zile la 3o-37°C, în anaerobiozã, pe medii speciale: de exemplu mediul Li Yan Po (albuş de ou coagulat acoperit cu gălbenuş diluat în soluţie salinã). Uzual, la pacienţii cu examen microscopic negativ, se recurge la multiplicarea borreliilor în gazde vii. Sînge de la bolnav se inoculeazã intraperitoneal la şobolani de 3-5 zile. Probe de sînge din coada animalelor sînt examinate zilnic la microscop pentru depistarea borreliilor.

18.3. Genul Leptospira

Leptospirele patogene sînt reunite în specia Leptospira interrogans, iar cele saprofite în specia L.biflexa.

18.3.1. Identificarea microscopicã. Examinate între lamã şi lamelã la microscopul cu fond negru, leptospirele apar ca organisme filamentoase de 15-2o μm lungime, foarte subţiri, cu spire puţin adînci, strînse şi regulate, cu extremitãţile rãsucite în cîrlig (fig.2-13), animate de mişcãri vii de înşurubare, flexie, translaţie.

18.3.2. Caractere de culturã. Leptospirele cultivã aerob la 28°C şi întuneric în medii speciale (soluţii saline tamponate la pH 7,2-7,4 şi îmbogãţite cu ser de iepure, peptonã sau infuzie de carne). Cultivã în lo-3o zile lãsînd mediul nemodificat. Apariţia culturii se urmãreşte prin microscopie pe fond negru.

18.3.3. Caractere de patogenitate. Cobaii inoculaţi (intraperitoneal, subcutan, percutan) cu leptospire fac o infecţie bacteriemicã a cãrei gravitate este în raport cu patogenitatea tulpinii inoculate. Animalele inoculate se termometrizeazã zilnic. In prima zi de febrã se recolteazã sînge din cord pentru hemocultură şi examen microscopic pe fond negru. La necropsia animalelor decedate se constatã icter, hemoragii cutanate şi în viscere (ficat, rinichi, pulmoni). Leptospirele sînt evidenţiate în sîngele cardiac şi în omogenatele de ficat şi splinã prin microscopie pe fond negru şi prin cultivare. In absenţa semnelor de boalã, probe de sînge se examineazã la intervale de 3-4 zile timp de 2o zile.

18.3.4. Identificarea antigenicã a leptospirelor se face cu seruri imune de referinţã prin reacţii de aglutinare-lizã, care se citesc la microscopul cu fond negru. Leptospirele patogene sînt clasificate în 18 serogrupe şi 125 serotipuri.

Scanned with OKEN Scanner

19. IDENTIFICAREA PRINCIPALILOR FUNGI IMPLICATI IN INFECTII UMANE

PETRU GH. GHERASIM şi DUMITRU T. BUIUC

Micozele, bolile cauzate de fungi, se manifestă frecvent la pacienţii supuşi unei antibioterapii prelungite sau la cei cu apărarea antiinfecţioasă compromisă prin administrarea de droguri imunosupresive sau prin diverse boli de fond.

19.1. Criterii elementare de clasificare a fungilor

Levurile: fungi unicelulari cu aspect rotund sau ovalar; pe medii de cultură formează colonii opace, cremoase.

Fungii filamentoşi: fungi multicelulari constituiţi din filamente tubulare, ramificate, numite hife, care se întreţes într-o structură de bază numită miceliu. Unui miceliu îi distingem 2 părţi: partea vegetativă, care creşte în sau pe substrat cu rolul de a absorbi substanţele nutritive, şi partea reproductivă, care creşte erect deasupra substratului şi produce organele de fructificare purtătoare de spori caracteristici. Coloniile fungilor filamentoşi sînt mase miceliene cu aspect pîslos, pufos.

Fungii dimorfi în ţesuturi sau în culturi incubate la 37°C se dezvoltă ca levuri (faza tisulară sau parazitară), iar în culturi incubate la 2o-26°C au dezvoltare micelianâ (faza saprofită). Majoritatea fungilor patogeni sînt dimorfi. De aceea pentru identificarea lor este esenţial să se demonstreze conversia de la o fază la alta.

Inmulţirea fungilor se face vegetativ, asexuat şi sexuat. Fungii imperfecţi sînt acei fungi la care înmulţirea sexuată nu a fost demonstrată. Majoritatea fungilor patogeni pentru om sînt fungi imperfecţi. In toate cele 3 forme de înmulţire a fungilor sporularea joacă un rol important. Sporii fungici apar ca organe de înmulţire, propagare şi, unii dintre ei, de rezistenţă. Modul de sporulare ca şi tipul sporilor sînt criterii microscopice importante pentru identificarea fungilor.

In cursul înmulţirii vegetative spori apar prin înmugurire sau prin dezarticularea şi separarea unor porţiuni din miceliul vegetativ. Distingem:

Scanned with OKEN Scanner

(i) Blastosporii apar prin înmugurirea levurilor, a unui micoliu sau pseudomiceliu (fig.19-1).

(ii) Chlamidosporii sînt spori rezistenţi cu perete gros care se formează prin rotunjirea şi îngroşarea celulelor terminale ale hifelor (fig.19-1).

(iii) Artrosporii sînt spori rezistenţi cu perete gros, cu aspect cilindric sau în butoi, rezultaţi prin fragmentarea micoliului (fig.19-1).

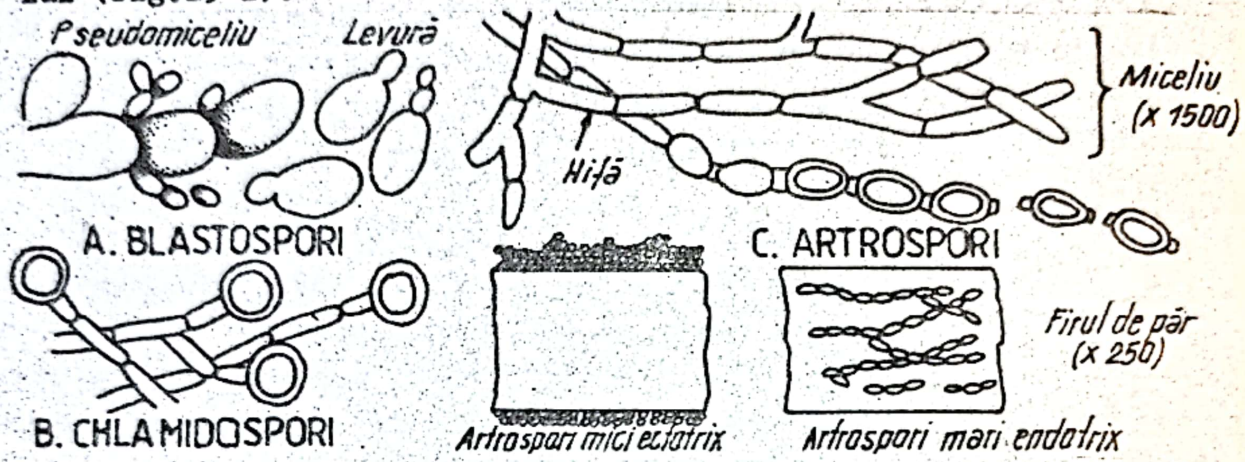


Fig.19-1 Spori asexuaţi produşi de hife: A - blastospori, B - chlamidospori, C - artrospori

Inmulţirea asexuată se realizează prin spori formaţi în organe de fructificare specializate.

(i) Conidiile sînt spori asexuaţi formaţi pe conidiofori. Unele sînt mici (microconidii) unicelulare, rotunde, eliptice sau piriforme, sesile sau pedunculate. Altele sînt mari (macroconidii), obişnuit septate, măciucate sau piriforme (fig.19-2).

(ii) Sporangiosporii sînt spori asexuaţi formaţi în sporangi purtaţi de tulpini aseptate, sporangiofori (fig.19-2).

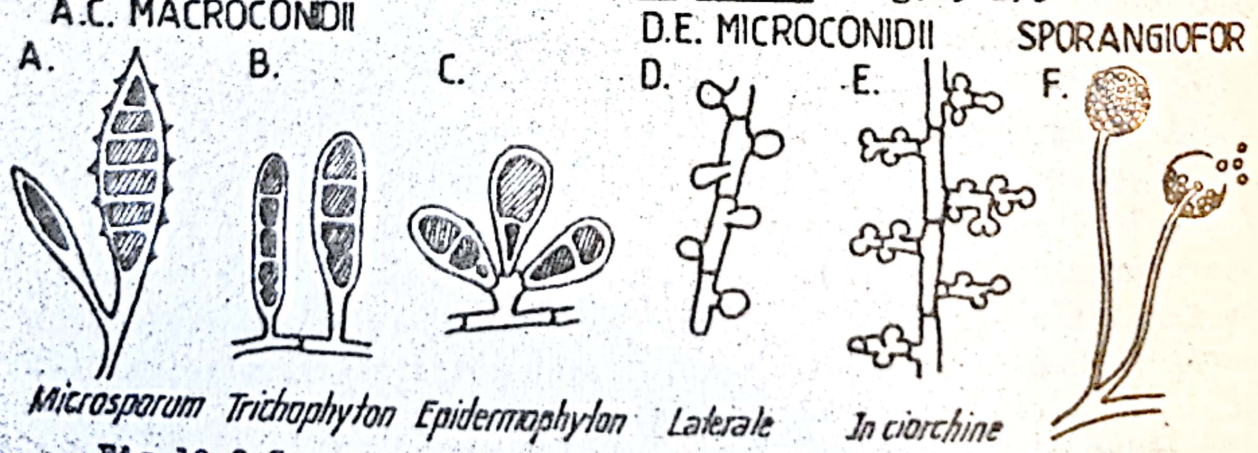


Fig.19-2 Spori asexuaţi formaţi în organe de fructificare: A-C diferite macroconidii; D,E diferite microconidii, F sporangiofori

19.2. Metode de studiu a fungilor

19.2.1. Recoltarea probelor

Probele de exsudate (puroi, spută ş.a) sau, uneori, sînge, l.c.r., urină se recoltează cu aceleaşi precauţii pe care le luăm cînd urmărim depistarea şi studiul bacteriilor.

In dermato- şi onicomicoze, după badijonarea zonei afectate cu alcool de 70° şi uscarea regiunii, marginea activă a leziunii este răzuită cu un bisturiu steril iar scuamele rezultate sînt colectate într-o cutie Petri sterilă. La pacienţii cu onicomicoză răzuirea trebuie să intereseze unghia pînă la stratul intern. Firele de păr din zona infectată (scalp, barbă) se tund cu foarfecele şi se aleg pentru examinare firele cu luciu pierdut. Resturile de păr din zona leziunii se smulg cu pensa pentru a fi examinate împreună cu rădăcina. Firele de păr infectate cu unele specii (de exemplu, Microsporum audouinii şi M.canis) se pot selecta şi pe baza fluorescenţei galben-verzi pe care o prezintă la iradierea cu lampa Wood (ultraviolete) în camera obscură.

19.2.2. Examenul microscopic

Uzual se examinează cu obiectivul uscat 10x şi 40x preparate umede între lamă şi lamelă, necolorate sau colorate.

Probele fluide se examinează ca atare între lamă şi lamelă. Probele opace (scuame, păr ş.a.) sînt depuse pe lama de microscop într-o picătură de KOH soluţie 10% şi acoperite cu o lamelă. Preparatul se încălzeşte uşor la flacără sau pe o platină pînă la clarificare. Dacă soluţia de KOH este înlocuită prin albastru cotton 0,05% în lactofenol, diferenţierea fungilor în ţesuturile gazdei este mult ameliorată.

Coloraţia negativă cu tuş de India favorizează depistarea fungilor capsulaţi (Cryptococcus neoformans): o picătură din sedimentul l.c.r. sau de spută este omogenizată într-o picătură de tuş de India. Se acopere cu o lamelă şi se examinează. Capsula apare delimitată prin particulele de carbon care nu o pot penetra.

Frotiul Gram din diferite exsudate este util pentru depistarea levurilor.

19.2.3. Cultivarea

Mediile pentru izolarea şi studiul fungilor se repartizează în pantă în tuburi de 25/150 mm buşate cu bumbac pentru a permite aerarea culturii. Curent sînt folosite în paralel:

- agarul infuzie cord-creier cu sînge pentru incubarea la 37°C,

● agarul Sabouraud glucozat pentru incubarea la 18-26°C. Pentru izolări din probe contaminate, aceste medii sînt făcute selective prin adaos de penicilină şi streptomicină, inhibitori ai creşterii bacteriene care însă nu afectează dezvoltarea fungilor.

Tuburile sînt inoculate cu ansa sau cu acul spatulat în 1-2 puncte ale mediului, fără dispersie. Firele de păr se implantează în mediu prin extremitatea inferioară, după ce extremitatea superioară a fost îndepărtată cu un foarfece steril. Inoculum abundent favorizează dezvoltarea unor colonii mai tipice.

Urmărirea culturilor se face bisăptămînal timp de 4 săptămîni. Obişnuit, coloniile apar în cîteva zile şi sînt tipice pentru identificare în 1-2 săptămîni. Se examinează aspectul coloniilor, pigmentogeneza (suprafaţa şi reversul coloniilor, mediul înconjurător, consistenţa. Cu spatula se prelevă o porţiune din colonie, care se destramă, folosind 2 ace rigide, într-o picătură de alcool de 96° pe o lamă de microscop. După evaporarea alcoolului, pe preparat se depune o picătură de albastru coton o,o5% în lactofenol, se acopere cu o lamelă şi se examinează la microscop după cîteva minute.

19.2.4. Inocularea intraperitoneală la şoarece este utilizată în special pentru conversia fungilor dimorfi de la faza micelianã saprofită la faza levurică, tisulară, parazită.

19.3. Identificarea fungilor dermatofiţi

19.3.1. Genul Microsporum determină epidermofiţii foliculare cu afectarea părului şi localizarea extotrix a parazitului. Specia antropofilă M.audouinii determină la copii infecţii epidemice cu evoluţie cronică; specia zoofilă M.canis şi cea geofilă M.gypseum infectează accidental omul la care determină infecţii cu caracter mai acut şi fără tendinţă de răspîndire epidemică. De aceea diferenţierea speciei infectante este importantă.

Microsporum audouinii

Identificarea microscopică. Examenul direct depistează grupuri de spori mici dispuşi în jurul firului de păr, ectotrix. Preparatul din cultură evidenţiază hife puţin segmentate. Microconidii obişnuit lipsesc. Macroconidii, subţiri şi distorsionate, apar rar. In culturi bătrîne apar chlamidospori.

Caractere de cultură. Pe mediul Sabouraud cultivă lent. Formează colonii rotunde, fin pufoase, cu buton central pigmentat în

roz, de la care pleacă spre periferie proeminenţe radiare; prin transparenţă toată colonia apare roz.

Microsporum canis

Identificarea microscopică. Examenul direct depistează spori mici ectotrix. Preparatul din cultură evidenţiază hife septate şi foarte numeroase macroconidii fusiforme, multiseptate, cu pereţi groşi. Chlamidosporii, prezenţi uneori, sînt contorsionaţi.

Caractere de cultură. Pe mediul Sabouraud cultivă mai rapid decît M.audouinii formînd colonii galben-verzui cu miceliu aerian pufos care se ridică pe pereţii eprubetei. Coloniile bătrîne au aspect prăfuit, cenuşiu.

Microsporum gypseum

Identificarea microscopică. Examenul direct depistează lanţuri de spori mari ectotrix. Preparatul din cultură evidenţiază hife în formă de rachetă cu foarte numeroase macroconidii şi microconidii ovale.

Caractere de cultură. Pe mediul Sabouraud cultivă mai rapid decît M.audouinii formînd colonii plate cu aspect prăfuit, cu centrul cenuşiu-albicios şi marginea maronie. Reversul coloniei este roşu cenuşiu spre portocaliu.

19.3.2. Genul Trichophyton determină epidermofiţii foliculare cu afectarea unghiilor, a părului şi cu localizarea endotrix sau endo- şi ectotrix a parazitului. Diferenţierea speciilor antropofile (T.mentagrophytes, T.tonsurans) de cele zoofile (T.equinum) este importantă pentru motivele expuse mai sus. De asemenea este importantă individualizarea speciei T.schoenleinii agentul etiologic al favusului, infecţie gravă care duce la alopecie definitivă cu cicatrici inestetice.

Trichophyton mentagrophytes

Identificarea microscopică. Examenul direct depistează spori ectotrix. Preparatul din cultură evidenţiază hife în formă de „coarne de cerb" şi macroconidii septate cu extremitatea rotunjită şi un peduncul scurt, gros. Microconidiile sînt rotunde, izolate sau în ciorchini.

Caractere de cultură. Colonia la început albă cu centrul uneori acuminat, periferia cu radiaţii fine, pufoase, cu aspect albcrem, gipsos.

Trichophyton tonsurans

Identificarea microscopică. Examenul direct depistează endotrix lanţuri de artrospori mari. Preparatul din cultură evidenţiază frecvenţi artrospori; macroconidii rare, alungite, neregulate, cu perete subţire, rotunjite la capăt; microconidii ovalare, relativ numeroase, dispuse în formă de spic sau ciorchine compus.

Caractere de cultură. Colonii cu suprafaţa fin pufoasă, uşor gălbuie privită prin transparenţă. Uneori centrul coloniei prezintă un crater.

Trichophyton schoenleinii

Identificarea microscopică. Examenul direct depistează endotrix hife şi arii tubulare goale în care hifele au degenerat. Preparatul din cultură evidenţiază hife ramificate dichotomic, inegal segmentate; grupuri de artrospori de formă neregulată, aşezaţi ca oasele tarsului (tarse favice).

Caractere de cultură. Dezvoltă colonii galben-cenuşii, ca ceara, cu suprafaţa uneori zbîrcită.

Trichophyton equinum

Identificarea microscopică. Examenul direct depistează lanţuri de spori mari ectotrix. Preparatul din cultură evidenţiază hife în formă de rachetă, frecvente microconidii piriforme; macroconidiile uneori lipsesc.

Caractere de cultură. Dezvoltă colonii albe, pufoase, uşor cretate. Prin îmbătrînire, colonia capătă dorsal culoarea galben-roşcat, maroniu la centru şi gălbui periferic.

19.3.3. Genul Epidermophyton determină epidermofiţii nefoliculare fără afectarea părului şi unghiilor.

Identificarea microscopică. Examenul direct depistează în scuame prezenţa hifelor. Preparatul din cultură evidenţiază numeroase macroconidii măciucate cu perete fin, în majoritate neseptate Caracteristic, microconidiile lipsesc.

Caractere de cultură. Coloniile, iniţial albe şi granulare, devin apoi cenuşii-galbene, catifelate şi prăfoase cu şanţuri radiare.

19.4. Identificarea unor fungi implicaţi în infecţii subcutanate

Sporotrichum schenckii infectează plăgi ale tegumentelor expuse contaminării cu sol sau resturi vegetale (mînă, antebraţ, picior). Infecţia evoluează ca o celulită cu limfangită şi adenită

satelită supurată.

Identificarea microscopică. Frotiul Gram din puroi depistează, relativ rar, fungul cu aspectul unor corpi fusiformi, gram-pozitivi de cca 1,5/4 µm. Preparatul din cultură evidenţiază o reţea de hife septate şi ramificate avînd la capătul unei terminaţii grupuri de spori ovali sau sferici de culoare brună, cu perete dublu în culturile vechi.

Caractere de cultură. Coloniile tinere sînt cremoase, opace, netede, apoi suprafaţa devine zbîrcită, membranoasă, uşor pufoasă; Pigmentaţia variabilă cu tulpina: albă, galbenă, maro, brună.

Patogenitatea experimentală. Inoculat intraperitoneal la şoarece sau cobai, determină o orhită purulentă fungul fiind pus în evidenţă în puroi.

19.5. Identificarea unor fungi implicaţi în infecţii sistemice

19.5.1. Candida albicans

C.albicans este un comensal al mucoaselor orofaringiană, intestinală, genito-urinară. La gazde compromise determină infecţii bucale, vaginale (mărgăritărelul), cutanate, urinare, bronhopulmonare, diseminări hematogene cu localizări endocardice, meningiene ş.a.

Identificarea microscopică. Examenul direct, în preparat umed sau frotiu Gram, depistează celule mari de 2-5 µm, gram-pozitive, ovalare, înmugurite (blastospori). Blastosporii pot constitui scurte pseudomicelii. Preparatul din cultură pe medii uzuale evidenţiază celule levurice înmugurite gram-pozitive.

Preparatul din cultura de 18-24 ore la 25°C pe mediul PCB evidenţiază pseudomicelii cu chlamidospori.

Util pentru identificarea microscopică a C.albicans este testul de filamentare în ser. In o,5 ml ser de om sau animal nediluat se însămînţează bogat cultura cercetată. După 3 ore la 37°C mixtura ser-levură este examinată între lamă şi lamelă. Preparatul evidenţiază celule levurice rotunjite cu expansiuni tubulare (fig.19-3).

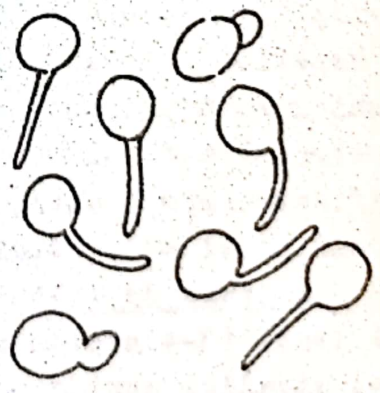


Fig.19-3 Candida albicans. Filamentare (micelizare) în ser

19.5.

Caractere de cultură. Dezvoltă în 24-48 ore, la temperatura camerei, colonii mici, S, rotunde, bombate, alb-gălbui, cremoase.

Identificarea biochimică. Cum filamentarea în ser nu este strict specifică pentru C.albicans, identificarea microscopică trebuie completată cu cercetarea spectrului de fermentare a zaharurilor.

19.5.2. Cryptococcus neoformans

C.neoformans determină infecţii exogene cronice ale pulmonului, creierului şi meningelui.

Identificarea microscopică. Examenul direct depistează celule levuriforme rotunde sau ovoide de 5-20 μm diametru cu dublu contur, înmugurite şi înconjurate de o capsulă groasă bine evidenţiată prin colorare negativă cu tuş de India. Preparatul din cultură evidenţiază celule înmugurite emiţînd terminal un scurt tub germinativ.

Caractere de cultură. Creşte repede la 37°C pe mediul Sabouraud formînd colonii mucoide galben-cenuşii. La temperatura camerei creşte lent.

Patogenitatea experimentală. Soarecele inoculat intraperitoneal cu o suspensie concentrată din cultura de 4-5 zile a fungului moare după 1-2 săptămîni. Necroptic se evidenţiază în abdomen şi creier mase gelatinoase de C.neoformans cu morfologie tipică în preparatul colorat cu tuş de India.

19.5.3. Hystoplasma capsulatum

Histoplasmoza este o infecţie a sistemului reticuloendotelial cu localizări pulmonare, hepatice, renale, cutanate, cerebrale.

Identificarea microscopică. Examenul atent cu imersia al frotiurilor din măduva sternală, al amprentelor ganglionare, splenice sau hepatice colorate Giemsa depistează în citoplasma macrofagelor şi mai rara a polimorfonuclearelor celule levuriforme de 2-4 μm diametru. Preparatul din cultură evidenţiază filamente miceliene ramificate, spori mici, rotunzi sau ovali; chlamidospori rotunzi sau piriformi cu peretele gros şi tuberculat.

Caractere de cultură. Cultura se obţine greu avînd o dezvoltare lentă (3-4 săptămîni). Coloniile sînt rotunde, uşor pufoase, albe; miceliul aerian cu timpul capătă culoare brună.

Patogenitatea experimentală. Soarecele inoculat intraperitoneal cu o suspensie de cultură face o infecţie generalizată. Pe amprentele din ficat şi splină, colorate Giemsa, se observă intra-

celular celule levuriforme tipice. Inocularea la şoarece se poate practica şi în scopul izolării fungului din produse patologice.

19.5.4. Coccidioides immitis

Coccidioidoza evoluează ca o infecţie cronică bronhopulmonară care, ocazional, se poate disemina cu localizări supurative la nivel osteo-articular şi cutanat.

Identificarea microscopică. Examenul direct depistează în spută, puroi ş.a. sferule (sporangii) cu diametrul de 2o-2ooμm şi perete gros conţinînd material granular sau, la maturitate, numeroşi endospori. Preparatul din cultură evidenţiază hife septate, fiecare segment reprezentînd artrospori aşezaţi în formă de lanţuri. Uneori sînt prezenţi şi chlamidospori.

Caractere de cultură. Dezvoltă în 4-5 zile colonii rotunde, cenuşii prezentînd un miceliu aerian pufos care se închide la culoare cu timpul.

Patogenitatea experimentală. Suspensia de artrospori inoculată intraperitoneal la cobai sau şoarece determină în interval de cca 1 săptămînă leziuni care conţin sferule mature de C.immitis. Inocularea intraperitoneală la animal poate folosi şi pentru izolarea cu identificarea fungului.

20. IDENTIFICAREA VIRUSURILOR

MIRCEA GH. ALEXANDRESCU

Identificarea virusurilor izolate are ca scop:

- diferenţierea infecţiei virale de infecţia bacteriană;
- stabilirea familiei sau grupului de virus cu implicaţie în prognosticul infecţiei (de exemplu, encefalită cu virus ECHO - encefalită herpetică);
- definirea speciei de virus şi serotipului devine din ce în ce mai necesară pentru elaborarea măsurilor de profilaxie specifică (vaccinare) şi terapie (substanţe antivirale).

Identificarea virusului izolat se bazează pe:

- studiul leziunilor histopatologice (inflamatorii, degenerative, incluzii etc.);
- studiul caracterelor clinice ale bolii experimentale provocate la animale de laborator;
- evidenţierea unor proprietăţi ale virusului: comportament la acţiunea unor agenţi fizici (căldură, frig, radiaţii ultraviolete), chimici (glicerină, eter, sodiu dodecyl sulfat), acidul nucleic, dimensiunea şi morfologia virionilor (microscopie electronică);
- efectuarea probelor imunologice de identificare cu ajutorul serurilor imune specifice cunoscute (de referinţă) şi, mai recent, a anticorpilor monoclonali. Dintre probele imunologice efectuate pentru identificarea virusurilor reţinem:

(i) Reacţia de neutralizare i n v i t r o. Virusul de identificat este amestecat cu seruri imune cunoscute iar amestecurile inoculate la gazde receptive (culturi de celule, ouă embrionate, animale de laborator). Dacă virusul de identificat corespunde specific anticorpilor prezenţi în unul din serurile imune folosite, el este neutralizat şi amestecul respectiv inoculat la gazde de laborator nu va produce modificările caracteristice infecţiei ci:

- inhibarea apariţiei efectului citopatogen,
- inhibarea reacţiei de hemadsorbţie,
- anularea inhibării metabolismului celulelor infectate cu

virus,

. reducerea sau anularea numărului de plaje în culturi de celule;

. reducerea numărului de leziuni pe membrana coriocalantoidiană a embrionului de găină.

(ii) Reacţia de fixare a complementului. Se folosesc antigene preparate cu virusul de identificat şi seruri imune de referinţă (⟶5.2.1.3.) In funcţie de natura antigenului (corpuscular, solubil) reacţia va permite o identificare de grup (familie de virus) sau de serotip.

(iii) Reacţia de inhibare a hemaglutinării. Virusurile hemaglutinante pot fi identificate cu ajutorul RIH. Neutralizarea hemaglutininei împiedică producerea hemaglutinării caracteristice (⟶5.2.1.4.3.)

(iv) Tehnicile care folosesc anticorpi marcaţi evidenţiază rapid şi identifică cu precizie localizarea virusurilor sau antigenelor virale în produsele patologice (celule din sedii afectate: piele, epiteliul respirator, l.c.r., sînge, urină sau amprente cu fragmente tisulare bioptice sau necroptice). In funcţie de trasor metodele utilizate se clasifică în:

. imunofluorescenţă (marcaj cu isothiocianat de fluoresceină) (⟶5.2.1.5.1.);

. imunoferitină (examinare la microscopul electronic);

. imunoperoxidază (examinare la microscop optic sau electronic); tehnicile ELISA au permis diagnosticul rapid al infecţiilor cu virusurile herpes 1 şi 2, virusul Epstein Barr, virusul citomegalic, virusurile hepatitei A şi B, virusul rabic, rotavirus etc.

. radioimuntestarea în care serul imun este marcat radioactiv iar complexele antigen-anticorp sînt detectate în faza solidă prin măsurarea numărului de impulsuri radioactive.

Scanned with OKEN Scanner

21. HEMOCULTURA IN DIAGNOSTICUL INFECTIEI

DUMITRU T. BUIUC

21.1. Aspecte generale

Sîngele normal este steril şi dispune de capacităţi importante de clearance bacterian (sistemele celulare fagocitare, sistemul complement ş.a.). De aceea numărul bacteriilor vehiculate de sînge în cursul bacteriemiilor şi septicemiilor rămîne, cu excepţia sugarilor, în general foarte mic.

Bacteriemia se caracterizează prin prezenţa tranzitorie a unei bacterii în sînge ca urmare a descărcării bacteriene, limitată cantitativ şi în timp, de la nivelul unui focar infecţios sau a unei mucoase lezate. Starea bacteriemică poate fi lipsită de expresie clinică sau cel mult se însoţeşte de frison şi febră.

Septicemia este o infecţie generală determinată de descărcări masive, continui sau recurente, în sînge a bacteriilor dintr-un focar infecţios. Prezenţa în curentul circulator a bacteriilor, a toxinelor lor şi a produselor de dezintegrare celulară se traduc clinic prin sindromul septicemic - frisoane, febră, prostraţie, erupţii cutanate - care lasă pe al doilea plan simptomatologia focarului infecţios septicemic. In septicemia netratată mortalitatea este foarte mare, tendinţa la vindecare spontană este o excepţie.

Diagnosticul septicemiei şi bacteriemiei se stabileşte prin hemocultură.

21.1.1. Spectrul etiologic al bacteriemiilor şi septicemiilor

Bacteriile care se izolează în hemoculturi, în ordinea frecvenţei actuale, sînt:

- Stafilococi coagulazo-pozitivi,
- Enterobacteriaceae condiţionat patogene (Escherichia, Klebsiella, Serratia, Proteus),
- Streptococi α şi β-hemolitici,
- Pneumococi,
- Enterococi,
- Haemophilus influenzae,
- Clostridium perfringens,
- Pseudomonas aeruginosa,
- Anaerobi nesporulaţi,
- Neisseria meningitidis,
- Salmonella spp,
- Stafilococi coagulazo-negativi
- Listeria monocytogenes,
- Leptospira,
- Brucella spp.

21.1.2. Indicaţ[illegible] hemoculturii

Pacienţi cu sindrom septicemic.

Pacienţi cu infecţii sistemice determinate de bacterii înalt patogene: febre enterice, bruceloză, pestă, tularemie, morvă, melioidoză.

Pacienţi cu endocardită bacteriană subacută.

Infecţii bacteriemice determinate de bacterii condiţionat patogene: pneumonii, meningite, peritonite, infecţii puerperale, infecţii ale plăgilor şi arsurilor, osteomielite, infecţii ale căilor urinare, biliare ş.a.

Pacienţi cu sindroame febrile fără cauză precizată.

Condiţii bacteriemice cum sînt: intervenţii operatorii în focare infecţioase cronice (instrumentaţia căilor urinare ş.a.), cateterism venos prelungit, tratament imunosupresiv sau/şi prelungit cu antibiotice la pacienţi debilitaţi.

Reţinem cu importanţă pentru practica hemoculturii:

- Varietatea condiţiilor bacteriemice.
- Varietatea largă a microorganismelor implicate.
- Gravitatea condiţiei septicemice.
- Intermitenţa prezenţei bacteriilor în sînge.
- Numărul în general redus al bacteriilor în sînge.

21.2. Momentul şi numărul recoltelor

> O singură hemocultură, chiar la un bolnav cu septicemie, poate să rămînă negativă. De aceea, la fiecare pacient cu indicaţie pentru hemocultură se efectuează 3 hemoculturi.

Concentraţii sanguine de antibiotic insuficiente pentru a asigura distrugerea bacteriei i n v i v o pot împiedica izolarea ei în hemocultură. De aceea

- cînd terapia antimicrobiană este o urgenţă - sindrom septicemic, meningite bacteriene, infecţii puerperale şi alte infecţii rapid extensive - se efectuează, înainte de administrarea primei doze de antibiotic, 3 hemoculturi la intervale de 1/2 oră;
- la pacienţii cu endocardită subacută cele 3 hemoculturi necesare se pot efectua în intervalul de 24 ore cît se poate temporiza terapia antimicrobiană.

Scanned with OKEN Scanner

Frisonul şi febra apar după cca 1-2 ore de la pătrunderea bacteriilor în sînge.

Este de dorit ca hemoculturile să se practice imediat ce frisonul şi-a făcut apariţia la pacienţi cu infecţii ale căilor urinare sau biliare, cu plăgi sau arsuri infectate, cu cateterizare venoasă prelungită, instrumentaţii ale căilor urinare ş.a. Aceasta presupune că o trusă pentru hemocultură este în permanenţă pregătită în salon.

Intr-o serie de infecţii bacteriemice cum sînt pneumonia pneumococică, febra tifoidă, leptospiroza ş.a. procentul hemoculturilor pozitive este mai mare în primele zile de boală şi scade progresiv pînă la anulare în următoarele zile. Sansa izolării brucelelor în hemocultură este maximă în stadiul acut al brucelozei.

21.3. Recoltarea şi însămînţarea probelor de sînge se face în condiţii de riguroasă asepsie.

Trusa pentru hemocultură:

- seringă sterilă de 2o ml, de preferat tip Luer pentru a fi sterilizată gata montată (fig.1-9);
- ac de rezervă;
- pensă;
- materiale pentru decontaminarea tegumentului: săpun lichid, alcool iodat 2%, eter, tampoane de vată, o bucată de muşama 4o/4o cm;
- garou;
- lampă de spirt;
- medii de cultură preîncălzite la 37°C;
- cutie izotermă pentru transportul hemoculturii la laborator.

Persoana care efectuează hemocultura trebuie să fie conştientă de precauţiile pe care trebuie să le ia pentru a evita orice posibilitate de contaminare în timpul recoltării sau însămînţării sîngelui.
Pătrunderea unei singure bacterii saprofite într-o plagă operatorie poate să nu aibă nici o urmare; ţesuturile se apără singure. Contaminarea hemoculturii cu o singură bacterie o compromite cu siguranţă.

Se lucrează la adăpost de curenţi de aer. Cel care efectuează hemocultura nu trebuie să poarte obligator mască dar trebuie să lucreze cu mîinile bine spălate, antiseptizate şi uscate.

Scanned with OKEN Scanner

Se aşează pacientul cu braţul confortabil pentru a evidenţia cît mai bine venele de la plica cotului. Se pune sub cot bucata de muşama. Se decontaminează plica cotului, pe o suprafaţă cît mai largă, cu săpun lichid apoi cu alcool iodat şi în final cu eter pentru a îndepărta alcoolul iodat şi pentru a usca perfect tegumentul. Pentru fiecare antiseptic se foloseşte un tampon de vată nou.

Se aplică garoul pe braţ şi se strînge pentru a evidenţia venele. Se aprinde lampa de spirt (atenţie ca flaconul cu eter să fie la distanţă). Se punţionează, fără palpare prealabilă, vena cea mai accesibilă şi se extrag 15-2o ml sînge la adult*). Se dă drumul la garou. Se retrage acul. Se face hemostaza. Se schimbă acul de puncţie cu acul de rezervă, folosind pensa sterilă, şi se însămînţează imediat sîngele.

Cu excepţia infecţiilor bacteriene sistemice specifice (febre enterice, bruceloză ş.a.), simptomatologia clinică nu sugerează prezenţa în sînge a unei anumite bacterii, iar examenul bacterioscopic este impracticabil datorită numărului foarte mic al bacteriilor din sînge. De aceea hemocultura se face pe medii şi în condiţii care satisfac exigenţele unui număr cît mai mare de specii microbiene aerobe şi anaerobe. Uzual se însămînţează cîte 5 ml sînge în

- 2 flacoane cu 5o ml bulion infuzie cord-creier, unul pentru incubare aerobă, celălalt pentru incubare în atmosferă cu CO_2, şi
- un tub de 25/25o mm cu 5o ml bulion VF cu acid thioglicolic şi albastru de metilen, în prealabil regenerat, pentru izolarea anaerobilor.

Imediat după însămînţare flacoanele se agită pentru omogenizarea conţinutului (cu atenţie pentru a nu contamina dopurile).

Volumul sîngelui însămînţat nu trebuie să depăşească lo% din volumul mediului; aceasta asigură o reducere a efectului său bactericid. Inglobarea în mediu a unui anticoagulant previne formarea cheagului opac în care pot fi mascate coloniile bacteriilor din sînge. Recomandată este adăugarea la mediu, în proporţie de o,o25-o,o5%, a polianetolsulfonatului de sodiu care, pe lîngă efectul anticoagulant, neutralizează şi activitatea bactericidă a

*) La sugar se recoltează prin puncţia jugularei 1-3 ml sînge.

sîngelui.

Flacoanele şi tuburile însămînţate cu sînge se transportă spre laborator în cutie izotermă.

Condiţii şi medii speciale sînt indicate cînd se solicită hemocultura pentru o anumită bacterie. In suspiciunea de bruceloză hemoculturile se fac de preferinţă în bulion fi-cat în mediu bifazic (fig.21-1); totodată se face şi inocularea sîngelui intraperitoneal la cobai. Pentru izolarea levurilor, de asemenea este recomandată hemocultura în mediu bifazic. Pentru izolarea leptospirelor se însămînţează cîteva picături de sînge în mai multe tuburi cu mediu Korthof iar 1,5-2 ml sînge sînt inoculaţi intraperitoneal la cobai.

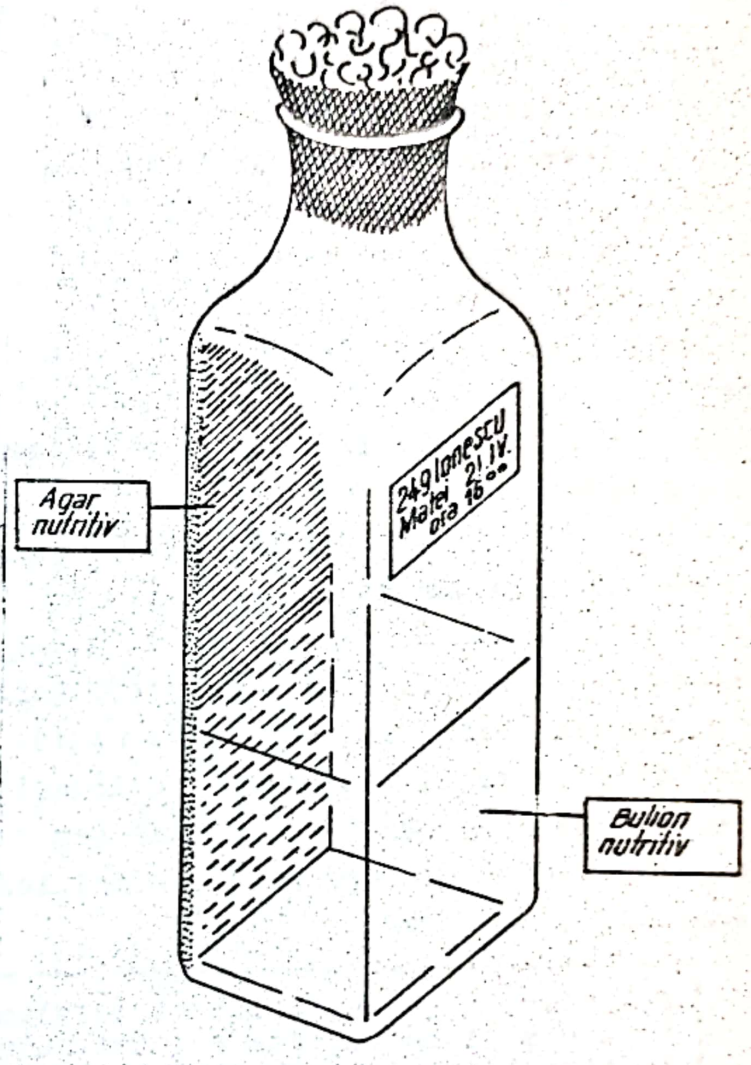


Fig.21-1 Hemocultura în mediu bifazic. Pentru urmărire, la fiecare 2 zile flaconul este inclinat pentru a inunda suprafaţa agarului, apoi readus la verticală şi incubat în continuare. Se urmăresc aspectul fazei lichide şi apariţia culturii pe faza solidă. Evită deschiderea repetată a flacoanelor pentru repicări. Avantajul este evident pentru hemoculturile care se urmăresc 3-4 săptămîni.

Hemocultura pe cheag transparent de fifibrină dă rezultate bune la pacienţi cu endocardită subacută: 6-8 tuburi de 18/180 mm cu cîte 15 ml bulion infuzie cord-creier glucozat o,2% sînt însămînţate cu cîte 1-1,5 ml sînge prelins pe peretele uscat al tubului. Tuburile se incubează aerob în poziţie verticală. Se formează un cheag ancorat de peretele tubului şi transparent în porţiunea superioară prin sedimentarea hematiilor. Coloniile de streptococi viridans şi cele de

Staphylococcus epidermidis dezvoltate în porţiunea superioară a cheagului se observă cu uşurinţă prin transparenţă.

21.4. Urmărirea şi interpretarea hemoculturii

Hemoculturile sînt incubate la 37°C şi examinate zilnic timp de o săptămînă şi apoi după încă o săptămînă, la 14 zile putîndu-se da un rezultat definitiv. Pentru izolarea brucelelor, leptospirelor şi levurilor hemoculturile se urmăresc pînă la 30 zile.

Macroscopic se observă apariţia coloniilor pe stratul de hematii de la fundul balonului (de exemplu, coloniile de stafilococ), turbiditatea, hemoliza, modificarea culorii mediului, apariţia bulelor de gaz pe mediile anaerobe, apariţia coloniilor pe cheagul de fibrină.

Din flacoanele fără creştere evidentă se fac subculturi pe geloză-şocolat. Din flacoanele cu creştere evidentă se fac: (i) frotiuri care se colorează Gram şi (ii) subculturi cu epuizare pe plăci cu geloză-sînge pentru incubare aerobă, anaerobă şi în atmosferă cu CO_2. Aproximativ 5% din bacteriemii, mai ales la pacienţi cu arsuri, plăgi şi escare infectate, pacienţi neurologici sau cu tumori maligne, sînt mixte.

Cînd examenul microscopic evidenţiază în hemocultură un microorganism cu o densitate optimă sau care poate fi ajustată optim, se efectuează antibiograma difuzimetrică folosind drept inoculum hemocultura pozitivă.

> Pozitivarea hemoculturii şi rezultatul antibiogramei se impune a fi comunicate clinicianului într-un interval de timp cît mai scurt posibil. Identificarea ca specie a microbului izolat urmează a se efectua.

Prin antibiograma difuzimetrică se face o primă selecţie a antibioticelor active i n v i t r o ; în continuare se recomandă stabilirea CMI pentru antibioticul ales, urmată de verificarea nivelurilor inhibitorii şi bactericide realizate în sînge de către acest antibiotic.

Izolarea în hemocultură a unui accidental patogen rezident al tegumentelor (Staphylococcus epidermidis sau Propionibacterium acnes) obligă la argumentarea calităţii izolatului, de contaminant sau de infectant. Izolarea într-un singur flacon a unei singure hemoculturi, în afara unui context clinic sugestiv (endocardită subacută după intervenţie chirurgicală pe cord, şunt ventriculo-

venos pentru controlul hidrocefaliei, cateterism venos prelungit) pledează pentru calitatea de contaminant. Este precaut ca în cazul izolării în hemocultură a unor bacili difterimorfi să nu se tragă o concluzie pînă la identificarea speciei: P.acnes care poate fi un contaminant este un difterimorf ca şi Listeria monocytogenes care nu contaminează hemoculturile ci determină infecţii bacteriemice.

BIBLIOGRAFIE

Kunze M., Volk[illegible]n H., Köhler W. (1979): Untersuchungen zur Bedeutung der Haut kontamination bei Blutkulturentnahmen. Z.ges.innere Med.Grenzgeb., 34:662.

Roselle G.A., Watanakunakorn C. (1979): Polymicrobial bacteremia. JAMA, 242:2411.

Scheld W.M., Sande M.A. (1979): Endocarditis and intravascular infections. In Mandell G.L., Douglass R.G., Bennett J.E. (editori): Principles and practice of infectious diseases, John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto.

Scott A.C. (1979): Blood-culture technique: two needles or one ? Lancet, 1:1414.

Scanned with OKEN Scanner

22. EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL LICHIDULUI CEFALO-RAHIDIAN (LCR) IN DIAGNOSTICUL INFECTIILOR SISTEMULUI NERVOS CENTRAL

DUMITRU T. BUIUC

22.1. Aspecte generale

Lichidul cefalo-rahidian (l.c.r.) normal este steril. In cursul infecţiilor sistemului nervos central (meningite, meningo-encefalite) în l.c.r. se pot urmări:

- prezenţa microbului infectant (virus, bacterie, levură);
- o sumă de modificări care reflectă fenomenele inflamatorii infecţioase (pleiocitoză, hiperproteinorahie, apariţia anticorpilor ş.a.), metabolismul microbian (hipoglicorahie, apariţia alcoolului etilic ş.a.), perturbări hidroelectrolitice în circulaţia sistemică pe fondul hiperproteinorahiei (hipoclorurorahia).

Infectarea sistemului nervos central se poate produce

(i) Pe cale hematogenă în cursul unei viremii sau bacteriemii cu variate porţi de intrare, mai frecvent nasofaringiană (enterovirusuri, meningococ, pneumococ, Haemophilus influenzae, virus urlian ş.a.), digestivă (enterovirusuri).

(ii) Direct din nasofaringe prin tecile limfatice olfactive (meningococ, pneumococ, H.influenzae);

din focare infecţioase juxtameningiene (otomastoidită, sinuzită ş.a.);

din exterior (conduct auditiv extern, tegumente, nasofaringe) după fracturi craniene (meningite traumatice cu cel mai variat spectru etiologic), puncţii rahidiene sau intervenţii chirurgicale pe nevrax (meningite iatrogene cu tulpini bacteriene de spital) şi la pacienţi cu anomalii congenitale (meningocel ş.a.).

De aceea, examenele bacteriologic sau virologic al sîngelui şi ale probelor de la variatele porţi de intrare ale infecţiei sînt examene complementare în diagnosticul microbiologic al infecţiilor meningo-encefalice.

Cele mai frecvente infecţii virale ale sistemului nervos central sînt cele cauzate de enterovirusuri (Coxsackie, ECHO) şi de

22.1.

virusul urlian. Prevalenţa lor este în funcţie de prevalenţa enterovirozelor şi a infecţiei urliene pe colectivităţi, grupe de vîrstă, sezon. Alte infecţii virale sînt rare, coriomeningita limfocitară, sau foarte rare, encefatita herpetică. In R.S.R. meningoencefalitele arbovirale sînt infecţii foarte rare.

Bacteriile care se izolează din l.c.r., în ordinea frecvenţei, sînt:

(i) la nou născut şi sugarul pînă la 2 luni

Enterobacteriaceae (Escherichia coli ş.a.), Streptococcus agalactiae, Stafilococi coagulazo-pozitivi, Pneumococi, Haemophilus influenzae, Bacilul piocianic, Listeria monocytogenes

(ii) la copil

Neisseria meningitidis, Pneumococi, H.influenzae, Mycobacterium tuberculosis, Leptospira

(iii) la adult

Pneumococi, N.meningitidis, Stafilococi cogulazo-pozitivi, Bacili gram-negativi, Anaerobi nesporulaţi, L.monocytogenes, M.tuberculosis, Leptospira

Meningitele micotice sînt rare.

Meningitele bacteriene beneficiază de tratament antibacterian şi se vindecă dacă sînt tratate precoce şi corect. Dau o mortalitate mare dacă nu sînt tratate şi lasă sechele grave dacă sînt tratate tardiv şi incorect. Meningitele virale, deşi nu beneficiază încă de tratament antiviral, în majoritatea lor evoluează benign.

Reţinem cu importanţă practică pentru diagnosticul de laborator al infecţiilor meningoencefalitice:

- Examenul l.c.r. este o urgenţă de laborator,
- varietatea bacteriilor infectante,
- semnificaţia depistării şi identificării precoce a bacteriei infectante,
- semnificaţia antibiogramei,
- controlul antibioterapiei.

22.2. Recoltarea şi transportul probelor de l.c.r.

Recoltarea se face prin puncţie, obişnuit, lombară în condiţii riguros aseptice. Cantitatea necesară pentru examen, 4-6 ml,

Scanned with OKEN Scanner

se recoltează în 2 tuburi de centrifugă şi se transportă la laborator, fără întîrziere, în cutie izotermă, la 37°C.

22.3. Examenul de laborator al l.c.r.

22.3.1. Examenul macroscopic

L.c. r. normal este incolor, clar şi fluid ca apa de izvor. In cursul unei meningite, în funcţie de importanţa reacţiei celulare şi de numărul germenilor, l.c.r. poate rămîne clar sau devine opalescent, purulent şi, rareori, hemoragic. Uneori prezintă un fin cheag (văl).

Unul din tuburi, după prelevarea cantităţii de lichid necesară examenului citologic cantitativ, este centrifugat 10-15 minute la 1000xg. Se notează aspectul supernatantului şi al sedimentului. Supernatantul este decantat aseptic şi supus examenelor biochimice. Din sedimentul resuspendat într-o mică cantitate de lichid se fac

- însămînţări pe medii de cultură solide (→ 22.3.5.2.),
- 3 frotiuri pe lame noi, neutilizate*)

Dacă proba prezintă văl, acesta se prelevă steril şi din el se efectuează cele 3 frotiuri. Celulele şi bacteriile, dacă sînt prezente, se adsorb pe vălul de fibrină. Restul probei se centrifughează.

22.3.2. Examenul citologic cantitativ se face, după agitarea probei, în celulă Fuchs-Rosenthal (fig.22-1) sau, în cazul probelor purulente, celulă Bürcker-Türck.

Normal, l.c.r. conţine $\leqslant 3$ elemente celulare nucleate/mm^3 (de regulă limfocite). Numărul leucocitelor în l.c.r. prezintă o creştere variabilă în funcţie de natura şi stadiul evoluţiv al meningitei: $\sim 10^4$ elemente/mm^3 în meningitele acute bacteriene (aspect purulent), 50-1000 elemente/mm^3 în meningitele virale (lichid clar sau opalescent), 50-500 elemente/mm^3 în meningita tuberculoasă (lichid clar sau opalescent). In faza precoce a meningitelor bacteriene numărul elementelor celulare nucleate în l.c.r. poate fi redus. La probe cu văl sau cheag numărul elementelor celulare trebuie considerat aproximativ şi minimal.

*) Evită rezultatele fals pozitive prin bacterii aderente pe lame insuficient spălate după utilizări anterioare.

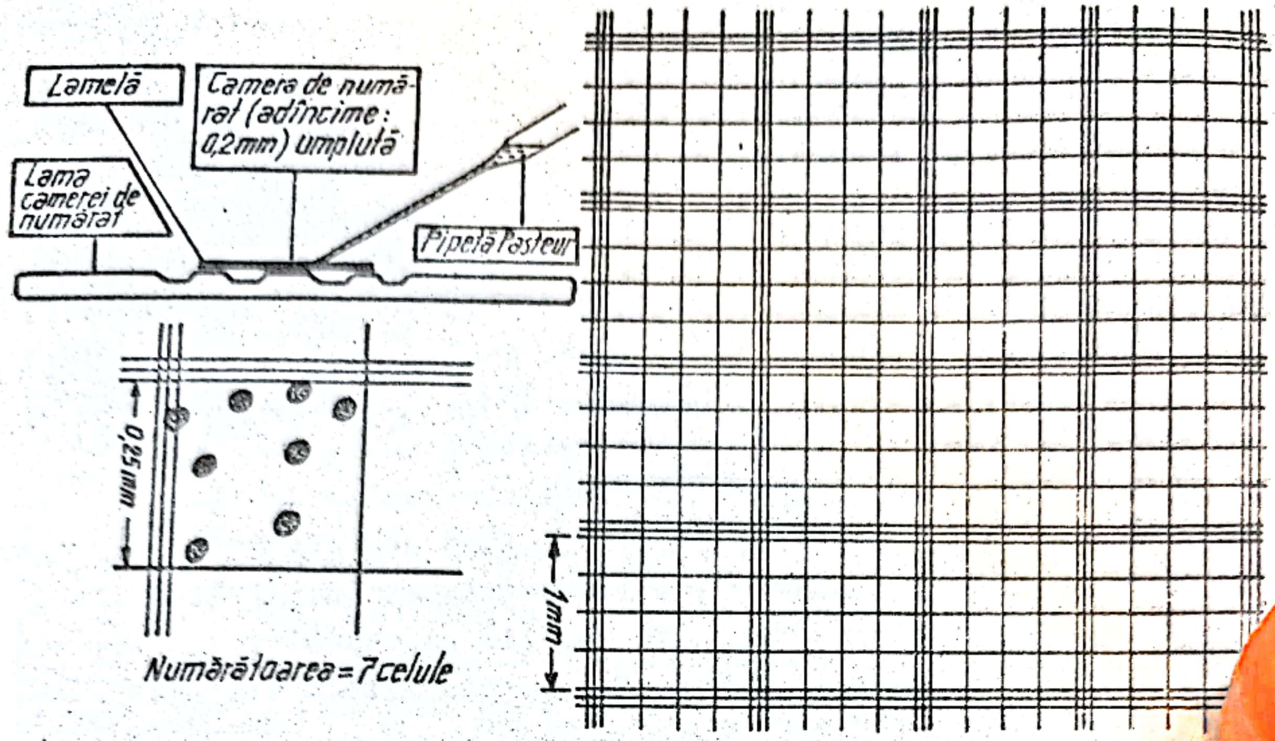


Fig.22-1 Camera de numărat Fuchs-Rosenthal. Umplerea (sus stînga): 0,5 ml l.c.r. omogenizat + 0,5 ml soluţie Türck se amestecă într-un tub şi se omogenizează prin barbotare cu pipeta Pasteur. Folosind aceeaşi pipetă se umple camera cu amestecul omogenizat. Reţeaua de numărat (dreapta), numărătoarea (jos stînga). Suprafaţa reţelei = 16 mmp, adîncimea = o,2 mm, volumul = 3,2 mm cubi (practic 3 mm^3). Se examinează cu obiectiv 20x, ocular 7x şi condensatorul coborît. Dacă densitatea celulelor nucleate este mică, se numără pe toate cele 16 pătrate mari. Nr.elemente celulare = (Σ16x2):3. Dacă densitatea celulelor este >loo pe un patrat mare, se numără pe 2-3 pătrate mari, se face media pentru un patrat mare şi se înmulţeşte cu lo.

22.3.3. Examenul citologic calitativ se face pe frotiul din sediment colorat cu albastru de metilen sau, mai bine, May-Grünwald-Giemsa.

Reacţia inflamatorie cu polimorfonucleare caracterizează meningitele bacteriene acute (meningite purulente). O putem întîlni şi în stadiul precoce (primele 24 ore) al meningitelor virale.

Reacţia inflamatorie limfocitară este caracteristică menigitelor virale şi meningitei tuberculoase.

22.3.4. Examenul biochimic al l.c.r. se efectuează pe supernatantul rezultat din centrifugarea probei. Se urmăresc: proteinorahia, glicorahia şi metaboliţi microbieni ai glucozei şi, în suspiciunea de meningită tuberculoasă, clorurorahia.

Proteinorahia normală: 15-4o mg% In meninhitele bacteriene acute sau în cea tuberculoasă proteinorahia creşte constant peste 1oo mg% In cele virale creşte uşor, fără a depăşi 1oo mg%. Excepţie face poliomielita unde creşterea proteinorahiei survine după dispariţia pleiocitozei (disociaţia albumino-citologică).

Glicorahia normală: 5o-7o mg% In meningitele bacteriene, inclusiv cea tuberculoasă, glicorahia scade constant sub 4o mg%, iar în cursul celor virale se menţine normală. La pacienţii cu meningite bacteriene, spre deosebire de cei cu meningite virale, acidul lactic creşte în l.c.r. peste limita normală de 35 mg% La pacienţii cu meningite micotice în l.c.r. apare alcoolul etilic, ca metabolit final al glucozei.

Clorurorahia normală: o,68-o,73 g% In meningita tuberculoasă clorurorahia scade sub o,6 g%

22.3.5. Examenul bacteriologic al l.c.r.

22.3.5.1. Depistarea rapidă a bacteriei infectante la pacienţi cu meningită bacteriană.

Examenul bacterioscopic este cel mai uzual şi are o sensibilitate de aproximativ 70% Se examinează frotiurile din sedimentul l.c.r. colorate cu albastru de metilen, Gram şi, în suspiciunea meningitei tuberculoase, Ziehl-Neelsen sau, mai bine, cu auramină. In suspiciunea meningitei micotice se va examina între lamă şi lamelă sedimentul probei de l.c.r. colorat negativ cu tuş de India.

Pentru a evita erorile de interpretare a frotiului Gram şi pentru a ameliora sensibilitatea de depistare a bacteriilor, examenul bacterioscopic al l.c.r. se poate completa cu imunelectoforeza contracurent pentru depistarea rapidă a antigenelor bacteriene (N.meningitidis, H.influenzae, S.pneumoniae, antigenul K_1 al E.coli).

Fiecare din aceste metode poate orienta rapid antibioterapia meningitelor bacteriene.

22.3.5.2. Izolarea

Investigarea probei de l.c.r. continuă cu izolarea bacteriei infectante, antibiograma şi, în final, identificarea sa.

(i) Prima zi. Pe cîte o placă cu geloză-sînge şi gelozăşocolat sînt însămînţate separat, fără epuizare, 1-2 picături din

sedimentul probei de l.c.r. (primul tub). Plăcile sînt incubate în borcan cu lumînare în atmosferă umedă.

Din proba de l.c.r. necentrifugată (al doilea tub) se însămînţează cu cîte 1 ml: un tub cu bulion glucozat, un tub cu bulion Lewinthal (bulion cu factori X şi V pentru izolarea H.influenzae). In meningitele otogene se însămînţează şi un tub cu bulion VF cu thioglicolat pentru izolarea anaerobilor.

Culturile se incubează peste noapte la 37°C.

(ii) A doua zi se examinează culturile.

- Pe plăci a apărut o cultură în aria inoculată. Se procedează la antibiogramă (nu se va omite confruntarea microscopică între izolat şi bacteria observată pe frotiul din l.c.r.) şi identificarea bacteriei izolate.

- Pe plăci nu a apărut o cultură. Se reincubează pentru alte 24 ore. Se examinează tuburile cu mediu lichid. Dacă prezintă turbiditate, se fac repicări pe medii adecvate după ce a fost examinat frotiul Gram din tuburile cu creştere.

- Dacă atît plăcile cît şi tuburile nu prezintă creştere evidentă, sînt reincubate la 37°C cu examinare zilnică pînă la 3 zile.

In cazurile suspecte de meningită tuberculoasă, se va epuiza întreaga cantitate de l.c.r. din cel de al doilea tub prin însămînţarea pe mai multe tuburi cu mediu Loewenstein-Jensen şi inoculare intraperitoneală la cobai. Dacă dispunem de o cantitate mai mare de l.c.r., se centrifughează 3o minute la 3ooo rpm iar sedimentul serveşte la însămînţări şi inoculare.

> In majoritatea meningitelor bacteriene agentul etiologic poate fi izolat dacă proba a fost recoltată înainte de începerea tratamentului antimicrobian.

22.3.6. Examenul virologic al l.c.r. (→ 35.) are indicaţiile diagnosticului virologic în general (→ 6.1.4.) şi o utilitate clinică actuală limitată.

BIBLIOGRAFIE

Arseni C., Chimion D. (1979): Lichidul cefalo-rahidian. Editura didactică şi pedagogică, Bucureşti, pp.187-221, 228-253.

Brook I., Bricknell K.S., Overturf G.D., Finegold S.M. (1978): Measurement of lactic acid in cerebrospinal fluid of pa-

sedimentul probei de l.c.r. (primul tub). Plăcile sînt incubate în borcan cu lumînare în atmosferă umedă.

Din proba de l.c.r. necentrifugată (al doilea tub) se însămînţează cu cîte 1 ml: un tub cu bulion glucozat, un tub cu bulion Lewinthal (bulion cu factori X şi V pentru izolarea H.influenzae). In meningitele otogene se însămînţează şi un tub cu bulion VF cu thioglicolat pentru izolarea anaerobilor.

Culturile se incubează peste noapte la 37°C.

(ii) A doua zi se examinează culturile.

- Pe plăci a apărut o cultură în aria inoculată. Se procedează la antibiogramă (nu se va omite confruntarea microscopică între izolat şi bacteria observată pe frotiul din l.c.r.) şi identificarea bacteriei izolate.

- Pe plăci nu a apărut o cultură. Se reincubează pentru alte 24 ore. Se examinează tuburile cu mediu lichid. Dacă prezintă turbiditate, se fac repicări pe medii adecvate după ce a fost examinat frotiul Gram din tuburile cu creştere.

- Dacă atît plăcile cît şi tuburile nu prezintă creştere evidentă, sînt reincubate la 37°C cu examinare zilnică pînă la 3 zile.

In cazurile suspecte de meningită tuberculoasă, se va epuiza întreaga cantitate de l.c.r. din cel de al doilea tub prin însămînţarea pe mai multe tuburi cu mediu Loewenstein-Jensen şi inoculare intraperitoneală la cobai. Dacă dispunem de o cantitate mai mare de l.c.r., se centrifughează 3o minute la 3ooo rpm iar sedimentul serveşte la însămînţări şi inoculare.

> In majoritatea meningitelor bacteriene agentul etiologic poate fi izolat dacă proba a fost recoltată înainte de începerea tratamentului antimicrobian.

22.3.6. Examenul virologic al l.c.r. (→ 35.) are indicaţiile diagnosticului virologic în general (→6.1.4.) şi o utilitate clinică actuală limitată.

BIBLIOGRAFIE

Arseni C., Chimion D. (1979): Lichidul cefalo-rahidian. Editura didactică şi pedagogică, Bucureşti, pp.187-221, 228-253.

Brook I., Bricknell K.S., Overturf G.D., Finegold S.M. (1978): Measurement of lactic acid in cerebrospinal fluid of pa-

Tabelul 22-1

Modificări microbiologice, citologice şi biochimice ale l.c.r. în cursul meningitelor

Tipul de meningită	Aspectul l.c.r.	Examen microbiologic	Examen citologic	Examen biochimic
L.c.r. normal	clar, incolor	steril	o-3 limfocite/mm cub	proteine 15- 4o mg% glucoză 5o- 7o mg% acid lactic 35 mg% cloruri 68o-73o mg%
Meningite bacteriene acute	opalescent, purulent (hematic)	se izolează bacteria	polimorfonucleare, cel mai frecvent >looo/mm cub	proteine loo mg% glucoză 4o mg% acid lactic 35 mg%
Meningita tuberculoasă	clar sau uşor opalescent	se izolează b.tuberculozei	limfocite ~2oo/mm cub	proteine loo mg% glucoză 4o mg% acid lactic 35 mg% cloruri 6oo mg%
Meningite micotice	clar sau opalescent	se izolează ciuperca	predomină limfocite loo-5oo/mm cub	proteine loo mg% glucoză 4o mg% alcool etilic prezent
Meningite virale	clar sau opalescent	steril bacteriologic; se poate izola virusul	limfocite în jur de 5oo-looo/mm cub	proteine 15-loo mg% glucoză 5o- 7o mg% acid lactic 35 mg% cloruri 68o-73o mg%

Scanned with OKEN Scanner

23. EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL PUROIULUI

MARIANA N. LUCA şi DUMITRU T. BUIUC

23.1. Etiopatogenia infecţiilor piogene

23.1.1. Infecţii ale plăgilor, arsurilor şi ulcerelor cutanate cronice

Se poate vorbi de o infecţie a plăgilor şi arsurilor cînd numărul bacteriilor la aceste nivele depăşeşte 10^5UFC/g ţesut sau 10^6UFC/tampon corect recoltat (→ 23.2.) In aceste condiţii cicatrizarea este ameninţată iar odată cu numărul bacteriilor creşte potenţialul bacteriemic şi septicemic al plăgii şi arsurii infectate. In arsurile septicemice numărul bacteriilor depăşeşte 10^8UFC /tampon.

Bacteriile care contaminează şi infectează plăgile şi arsurile au 2 origini, endogenă şi exogenă. Bacteriile întîlnite în infecţiile plăgilor variază în funcţie de mecanismul de producere (arsuri, intervenţii chirurgicale, traumatisme) şi de localizarea anatomică a plăgii.

● In arsuri întîlnim: frecvent stafilococi, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella, Enterobacter, enterococi; mai rar Moraxella, Proteus, Escherichia coli, Providencia, Hafnia. In ultimii ani sînt implicate, tot mai frecvent, în infecţiile arsurilor mycete: Candida, Phycomycetes, Aspergillus.

● Infecţia plăgilor traumatice are loc cu microbiota pielii, a cavităţilor vecine şi cu saprofiţii din praf, sol. In ordinea frecvenţei întîlnim:

Staphylococcus aureus,	streptococi alfa-hemolitici,
Streptococcus pyogenes,	streptococi beta-hemolitici
Escherichia coli,	(alţii decît cei grup A),
bacili difterimorfi,	cocci gram-pozitivi şi bacili
bacili antracoizi,	gram-pozitivi şi gram-negativi
Pseudomonas spp.,	din flora Veillon,
	Clostridium perfringens

Bacilii gram-negativi intestinali sînt frecvent implicaţi în infecţiile plăgilor din regiunea coapselor, feselor şi abdomenului inferior.

In infecţiile plăgilor de război sînt larg implicate bacteriile anaerobe, inclusiv clostridiile.

Scanned with OKEN Scanner

● Plăgile muşcate sînt frecvent infectate cu Pasteurella multocida.

● Plăgile chirurgicale din zone normal contaminate se pot infecta cu bacteriile din microbiota regiunii anatomice în care a avut loc intervenţia chirurgicală. Frecvent infecţiile plăgilor operatorii se produc cu tulpini de spital: S.aureus, P.aeruginosa E.coli, Proteus.

● In infecţiile ulcerelor cutanate cronice pot fi implicaţi: streptococi piogeni (grup A, G ş.a.), streptococi anaerobi, S.aureus, specii de Actinomyces, Nocardia, Mycobacterium, Treponema. De reţinut: investigarea unui ulcer cutanat cronic presupune şi examenele serologice pentru sifilis (32.4).

23.1.2. Infecţiile conjunctivale şi otice

● Bacteriile implicate mai frecvent în etiologia conjunctivitelor şi keratoconjunctivitelor sînt:

Haemophilus influenzae,	Streptococcus pneumoniae,
H.aegyptius,	S.aureus,
Moraxella lacunata,	P.aeruginosa,
	Enterobacteriaceae

● In etiologia otitelor externe sînt implicate

frecvent:	rar:
S.aureus,	bacili gram-pozitivi,
Pseudomonas spp	Actinomyces
	Mycobacterium spp

● In otitele medii acute sînt implicaţi cel mai frecvent S.pneumoniae, S.pyogenes, Haemophilus influenzae şi stafilococi coagulazo-pozitivi. In cele cronice frecvent infecţia este mixtă cu participarea anaerobilor nesporulaţi.

23.1.3. Infecţiile piogene ale seroaselor şi parenchimelor

Sînt frecvent urmarea propagării pe cale limfatică sau hematogenă a infecţiei din focare de la nivelul mucoaselor (uterină, faringiană, bronhopulmonară) sau tegumentelor (furuncule, celulile, plăgi, arsuri infectate). Alteori aceste infecţii apar prin soluţii de continuitate între învelişurile organismului şi cavităţile seroase (perforaţii intestinale etc.)

● In puroiul pleural bacteriile cel mai frecvent izolate sînt:

S.pneumoniae,	Enterobacteriaceae,
S.pyogenes,	Fusobacterium,
S.aureus,	Bacteroides,
P.aeruginosa,	streptococi anaerobi

● In puroiul peritoneal predomină enterobacteriaceele. Frec-

vent găsim asociaţii de bacterii gram-pozitive şi gram-negative, aerobe şi anaerobe.

o Artritele septice sînt monobacteriene şi găsim implicaţi stafilococi, streptococi, neisserii patogene, H.influenzae şi bacili gram-negativi.

In etiologia pleureziilor, peritonitelor şi artritelor o pondere importantă o are Mycobacterium tuberculosis.

23.2. Recoltarea şi transportul probelor de puroi

Trebuie avute în vedere

- colecţiile închise: pleurale, peritoneale, articulare, abcese, vezicule, flictene şi pustule;
- supuraţiile plăgilor, arsurilor; colecţiile fistulizate.

Recoltarea de la nivelul colecţiilor închise se face aseptic cu seringa. Decontaminarea tegumentelor se efectuează ca şi pentru hemocultură. Se recoltează 10-15 ml exsudat pleural sau peritoneal, 4-5 ml exsudat articular. Recoltările din leziunile superficiale închise (vezicule, flictene, pustule, furuncule) se fac prin puncţionare cu pipeta Pasteur sau cu seringa. Dacă exsudatul este în cantitate mică, se instilează ser fiziologic steril care apoi se aspiră.

Recoltarea de la nivelul fistulelor, a plăgilor profunde insuficient drenate se face din zone cît mai profunde prin aspiraţie cu seringa, căreia i se poate adapta un cateter.

Recoltarea de la nivelul plăgilor cutanate deschise şi arsurilor se face cu tamponul. Cînd se urmăreşte cuantificarea bacteriilor prezente în plagă, după îndepărtarea ţesutului necrotic, o suprafaţă de aproximativ 1 cm^2 se şterge cu tamponul suficient de insistent pentru a provoca o uşoară sîngerare a ţesutului subjacent. Tamponul se introduce apoi într-un tub steril conţinînd 1 ml bulion şi se expediază imediat la laborator. In acelaşi scop se poate efectua o biopsie tisulară: se recoltează prin puncţie dermică o cantitate de ţesut din zona plăgii. Tesutul astfel obţinut se introduce într-un tub steril care se transportă de urgenţă la laborator.

In ulcerele cutanate cronice se indică recoltarea lichidului interstiţial prin puncţionarea tegumentului sănătos de la periferia ulcerului cu un ac hipodermic şi aspiraţie cu o seringă etanşă.

Recoltarea probelor de puroi conjunctival se face cu tamponul

de către specialistul oftalmolog, iar a celor de puroi sinusal sau otic de către specialistul O.R.L.-ist (→25.1.2.)

Transportul probelor de puroi trebuie să se facă în cel mult 2 ore de la recoltare.

Unele bacterii anaerobe sînt omorîte în cîteva secunde în contact cu oxigenul atmosferic: altele, ca Bacteroides, Clostridium perfringens, Peptostreptococcus, supravieţuiesc 3o-9o minute în prezenţa a 2-8% oxigen. Puroiul recoltat prin punctie cu seringa este transportat la laborator prin procedeul „seringă anaerobă" (fig.7-2), care asigură supravieţuirea anaerobilor cel puţin 3o minute.

23.3. Examenul macroscopic. Se examinează consistenţa, culoarea, mirosul puroiului, prezenţa de granule ş.a. Puroiul cremos, bine legat sugerează infecţii stafilococice; cel fluid infecţii streptococice, iar cel cazeos infecţia tuberculoasă. Puroiul fluid cu granule mici gălbui („granule de sulf") este sugestiv pentru o infecţie actinomicotică. Puroiul de culoare albastră-verzuie pledează pentru infecţii cu bacil piocianic, iar cel verzui pentru infecţii pneumococice. Puroiul fluid, cenuşiu murdar şi fetid sugerează o infecţie cu bacterii anaerobe.

23.4. Examenul microscopic

Se efectuează 3 frotiuri care se colorează cu albastru de metilen, Gram şi Ziehl-Neelsen.

Examenul citologic efectuat pe frotiul colorat cu albastru de metilen este important. Prezenţa de polimorfonucleare nealterate indică un proces infecţios acut sau un proces tuberculos incipient. Polimorfonuclearele alterate denotă un proces infecţios în curs de abcedare. Predominanţa limfocitelor sugerează o infecţie cronică, tuberculoasă sau sifilitică.

Frotiul Gram din colecţii închise poate fi suficient pentru diagnosticul prezumtiv de infecţie pneumococică, stafilococică sau cu neisserii patogene.

In caz de suspiciune a tuberculozei, frotiul colorat Ziehl-Neelsen poate evidenţia prezenţa bacililor acido-alcoolo-rezistenţi.

Rezultatele examenului microscopic al puroiului din colecţii închise sînt raportate imediat clinicianului fiind utile în orientarea terapeutică.

Scanned with OKEN Scanner

Examenul microscopic pentru Actinomyces şi Nocardia. Granulele puroiului provenit din micetoame pot fi examinate prin sfărîmare între 2 lame de microscop flambate şi răcite. Prin separarea lamelor se obţin 2 frotiuri care se colorează unul Gram (→16.1.) şi celălalt Ziehl-Neelsen. Frotiul colorat Ziehl-Neelsen permite diferenţierea între Actinomyces şi Nocardia. Microorganismele din genul Actinomyces sînt totdeauna neacido-rezistente spre deosebire de nocardii care pot fi şi acido-rezistente.

23.5. Însămînţarea

Puroiul din colecţii închise se însămînţează pe : agar-sînge şi bulion VF. Puroiul din colecţii deschise se însămînţează numai pe medii solide, semicantitativ, deoarece conţine o floră bacteriană mixtă care include şi bacterii de contaminare. In circumstanţe clinice (localizarea infecţiei, vîrsta pacientului ş.a.) care sugerează prezenţa posibilă a H.influenzae (→23.1.2., 23.1.3.) însămînţarea probelor se va face şi pe agar ciocolat. Cînd este verosimilă prezenţa speciilor de Proteus (→23.1.1.) probele se vor însămînţa şi pe un mediu care inhibă caracterul invaziv al culturilor de Proteus (de exemplu, mediul Mac Conkey).

Dacă datele clinice, examenul citologic şi, eventual, examene bacteriologice anterioare negative pentru bacterii piogene sugerează o infecţie tuberculoasă sau micotică se fac însămînţări pe mediul Löwenstein-Jensen şi respectiv mediul Sabouraud.

Pentru cuantificarea bacteriilor în plăgi şi arsuri, ţesutul recoltat bioptic în acest scop este imediat cîntărit şi omogenizat în bulion steril. Probele recoltate pe tampon sînt descărcate prin agitarea şi stoarcerea tamponului într-o cantitate de 1 ml bulion steril. Se fac apoi diluţii decimale seriate şi cîte o,1 ml din fiecare diluţie sînt însămînţaţi pe plăci cu medii corespunzătoare

Mediile însămînţate sînt incubate aerob şi anaerob la 37°C pentru 24 ore. Dezvoltarea bacteriilor numai pe geloză sînge denotă o etiologie streptococică sau cu cocobacili din genul Pasteurella sau Moraxella. Dezvoltarea bacteriilor pe toate mediile (dacă s-au utilizat pentru însămînţare şi medii simple sau medii diferenţiale lactozate) indică bacterii aerobe facultativ anaerobe, nepretenţioase nutritiv.

De pe plăcile însămînţate semicantitativ se repică şi se identifică fiecare tip de colonie care predomină.

In cazul cultivării numai în anaerobioză se fac frotiuri.

Bacteriile anaerobe nesporulate sînt uzual (şi suficient) încadrate într-un grup morfotinctorial (→ 16.1.) şi sînt testate pentru sensibilitatea la antibiotice. Pentru clostridii este necesară identificarea (→15.2.)

Dacă constatăm absenţa cultivării bacteriilor pe toate mediile acestea se reincubează şi se examinează zilnic timp de 5 zile înainte de a se consemna un rezultat negativ.

Culturile pentru mycobacterii se urmăresc săptămînal timp de 8 săptămîni.

Apariţia culturii pe mediul Sabouraud se urmăreşte 24-96 ore.

23.6. Interpretarea rezultatelor

Bacteriile depistate în puroiul provenit din colecţii închise sînt implicate etiologic.

Bacteriile izolate din puroiul supuraţiilor sînt implicate etiologic pe baza criteriului semicantitativ sau cantitativ (→23.1.1.) Cel mai frecvent, într-o probă corect recoltată, bacteria dominantă este cea infectantă. Hemocultura pozitivă cu aceeaşi bacterie precizează diagnosticul.

Diagnosticul de gangrenă gazoasă, ca şi cel de tetanos, este clinic. Clinicianul este cel care decide dacă clostridiile depistate într-o plagă sînt contaminante sau infectante.

BIBLIOGRAFIE

Bailey W.R., Scott E.G. (1974): Microorganisms encountered in wounds: anaerobic procedure. In Diagnostic Microbiology, Bayley W.R., Scott E.G. (editori), C.V.Mosby Co, St.Louis.

Finland M., Barnes M.W. (1978): Changing ecology of acute bacterial empyema: occurrence and mortality at Boston city hospital durring 12 selected years from 1935 to 1972. J.Infect.Dis., 137:274.

Lindberg R.R., Monorief J.A., Switzer W.E., Order S.E., Mills W. (1965): The successful control of burn sepsis. J.Trauma, 5:601.

Loebl E.C., Marvin J.A., Heck E.L., Curreri P.W., Baxter C.R. (1974): The use of quantitative biopsy cultures in bacteriologic monitoring of burn patients. J.Surg.Res., 16:1.

Renkonen O.V. (1980): Some aspects of quantitative bacteriology in burn wounds. Ann.Chir.Gynaecol., 69:217.

Rohan J.E., Himmich H., Loirat P. (1980): L'infection chez les brûles. Gazette Med.France, 87:3903.

24. EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL URINII IN DIAGNOSTICUL INFECTIILOR TRACTUSULUI URINAR

DUMITRU T. BUIUC

24.1. Aspecte generale

24.1.1. Condiţia microbiologică a urinii

Normal, urina vezicală este sterilă, condiţie asigurată prin mecanismele antiinfecţioase ale căilor urinare (fluxul urinar, pH-ul acid, concentraţia crescută de uree a urinii ş.a.). In cursul micţiunii urina se contaminează cu microbiota uretrei distale, vulvei sau pliului balano-prepuţial.

In infecţiile tractusului urinar (ITU) în urină detectăm:
prezenţa bacteriei infectante - bacteriuria;
prezenţa unei reacţii inflamatorii - piuria.

In colonizarea urinii (condiţie patologică abortivă, tranzitorie, de multe ori premergătoare ITU) în urină detectăm bacteriuria, cu bacterii condiţionat patogene, fără piurie.

24.1.2. Etiopatogenia ITU

Cel mai frecvent ITU este determinată de bacterii condiţionat patogene din microbiota uretrei distale (infecţie ascendentă) la pacienţi cu predispoziţie înnăscută (particularităţile anatomice ale uretrei la sexul feminin, prezenţa de receptori ai uroepiteliului pentru anumiţi liganzi bacterieni) sau dobîndită (sarcină, uropatie obstructivă, imobilizare la pat, diabet ş.a.)

Aproximativ 90% din totalul ITU acute sînt determinate de Escherichia coli. Alte enterobacteriacee (Klebsiella, Enterobacter Proteus, Serratia) şi Pseudomonas aeruginosa cauzează numai o mică proporţie a ITU acute, dar sînt implicate frecvent în ITU recurente ale pacienţilor cu uropatie obstructivă sau cele asociate cateterului à démeure. Enterococii sînt implicaţi mai frecvent în ITU ale pacienţilor cu calculoză şi instrumentaţii ale căilor urinare. Staphylococcus saprophyticus determină ITU acute la femei tinere. S.aureus infectează căile urinare pe cale hematogenă. Levurile sînt mai rar o cauză a ITU.

ITU prin bacterii patogene sînt o eventualitate mai rară,

realizată pe cale descendentă, hematogenă în cursul unor infecţii sistemice. Localizarea renală a bacteriilor patogene poate fi o etapă obligatorie (cazul leptospirelor) sau întîmplătoare (cazul tuberculozei, brucelozei). In alte infecţii eliminarea prin urină a bacteriei patogene are loc fără ca localizarea renală să fie demonstrată (cazul febrelor tifoidice).

Adenovirusurile pot determina cistite hemoragice. In general însă, la om virusurile care se elimină prin urină nu determină manifestări de ITU.

Bacteriuria semnificativă. Bacteriile infectante ale tractusului urinar trebuie diferenţiate de contaminanţii normali ai urinii micţionate.

Urina este un mediu de cultură în care bacteriile condiţionat patogene ale ITU se multiplică în intervalul dintre 2 micţiuni pînă la valori mai mari de 100.000 unităţi formatoare de colonii (UFC)/ml.*) Contaminanţii normali ai urinii micţionate nu depăşesc 1000 UFC/ml (atunci cînd se iau măsuri pentru a recolta o probă curată din jet mijlociu → 24.2.1.)

Bacteriurie semnificativă pentru ITU este cea cu

- bacterii condiţionat patogene în cantităţi $>10^5$ UFC/ml*) sau cea cu
- bacterii patogene.

Piuria. Normal se elimină prin urină pînă la 400.000 leucocite/oră. La o diureză medie, aceasta corespunde la <10 leucocite/mm^3 urină, în majoritatea cazurilor <3 leucocite/mm^3. Eliminarea a >400.000 leucocite/oră (respectiv >10 leucocite/mm^3 urină) traduce o inflamaţie a căilor urinare şi o numim piurie.

24.2. Examenul citobacteriologic al urinii

24.2.1. Recoltarea probelor de urină pentru examenul bacteriologic se face în borcane de 250 ml sterile cu capac.

Recoltarea „curată" a unei probe de urină prinsă din jet

*) Această cifră corespunde capacităţilor de multiplicare în urină a enterobacteriaceelor, bacilului piocianic şi enterococilor. Pentru stafilococi viteza de multiplicare în urină este mai redusă iar pentru Candida şi mai redusă. De aceea bacteriuria semnificativă pentru ITU cu stafilococi este de 50.000 UFC/ml iar pentru cele cu Candida de 1000 UFC/ml.

mijlociu satisface în majoritatea cazurilor exigenţele examenului citobacteriologic al urinii. Este practicată cu succes numai la pacienţi cooperanţi, care pot fi instruiţi asupra exigenţelor recoltării. Presupune un cabinet de recoltă încadrat cu soră şi infirmieră special instruite şi cîteva dotări accesibile oricărui spital sau policlinici: chiuvetă, masă ginecologică adaptată anume recoltărilor de la femei (fig.24-1 şi 24-2), urinoar pentru recoltarea la bărbaţi. In fig.24-3 este prezentată schematic recoltarea corectă a unei probe curate prinsă din jet mijlociu la femeie. La pacientele cu scurgeri vaginale trebuie să intervină sora care pregăteşte de aceeaşi manieră regiunea vulvară iar în final introduce în vagin un tampon de vată. Menţionăm că o probă de 10 ml urină normală contaminată cu numai 0,1 ml scurgere vaginală

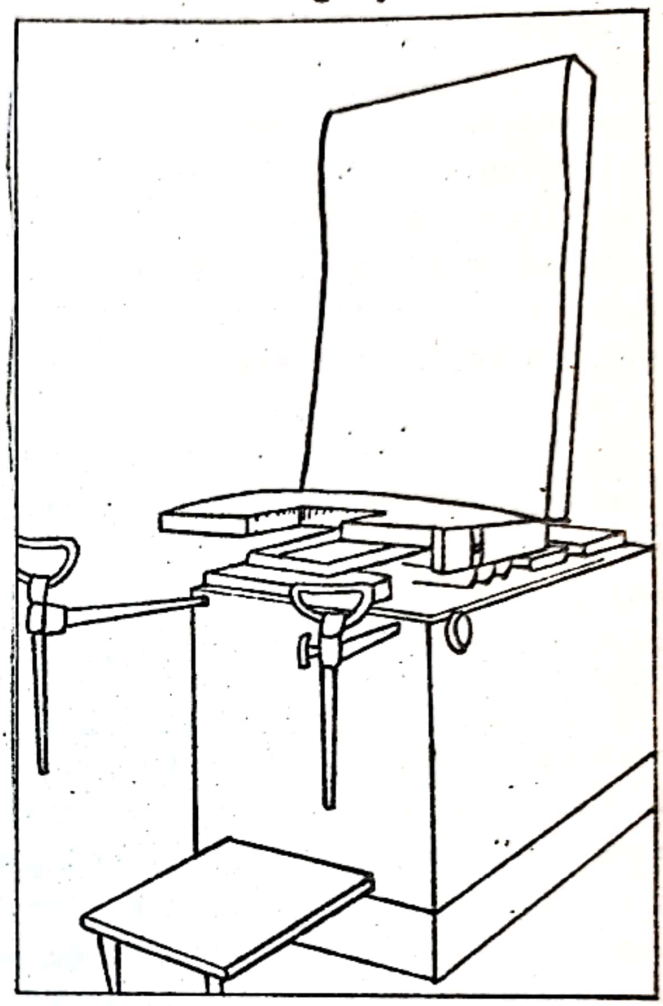


Fig.24-1 Sugestie pentru modificarea mesei ginecologice în vederea recoltei curate prinsă din jet mijlociu la femeie (după Washington II şi colab.)

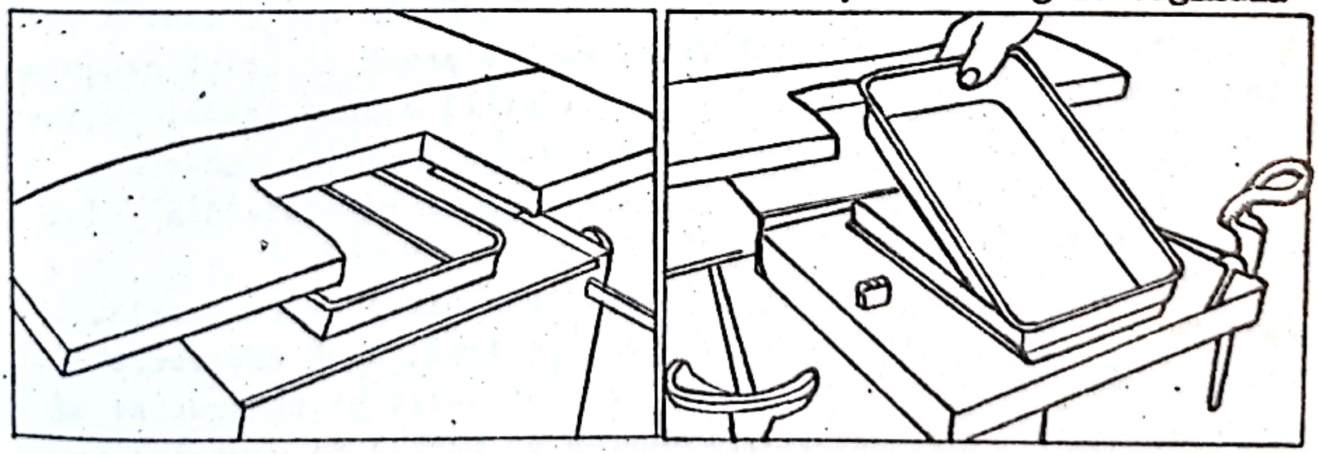


Fig.24-2 Detalii ale mesei ginecologice prezentată în fig.24-1: sertarul mesei cu tava inoxidabilă de colectare a apei de spălare şi urinii din primul şi ultimul jet.

Scanned with OKEN Scanner

prezintă în urocultura cantitativă 10^6 UFC/ml, evident un rezultat fals pozitiv.

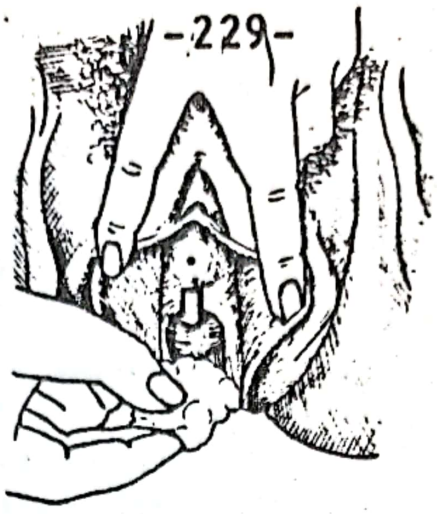
La bărbat se decalotează glandul retractînd prepuţul. Se decontaminează şi se usucă meatul urinar şi glandul, de manieră similară cu regiunea vulvară. Pacientul urinează cu glandul decalotat şi prinde în borcan, din zbor, cca 10 ml urină din jetul mijlociu. La pacienţi cu infecţii prostatice contaminarea probei de urină cu bacterii de la acest nivel este inevitabilă. Pentru stabilirea sediului infecţiei în aceste cazuri se recurge la recoltarea de probe seriate.

Recolta seriată la bărbat. Proba 1: primii 10 ml de urină eliminaţi. Proba 2: jetul mijlociu (după cca 200 ml urină de spălare). Masaj prostatic. Proba 3: secreţia prostatică. Proba 4: primul jet de 10 ml urină după masajul prostatic. Se face imediat numărătoarea bacteriilor viabile în fiecare probă.

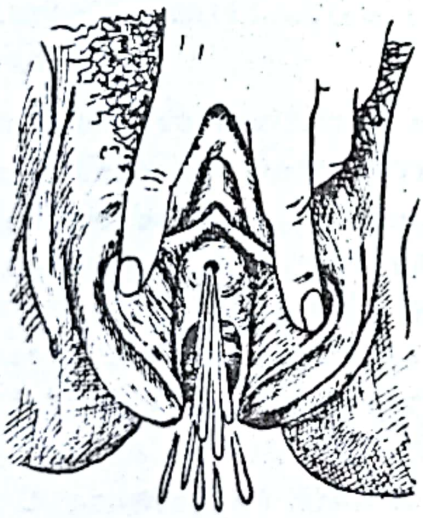
Recoltarea corectă de la copii prea mici pentru a putea coopera este dificilă. Se decontaminează şi se usucă organele genitale şi perineul. In jurul penisului sau vulvei se fixează orificiul unei pungi sterile din material plastic. In lipsa unui asemenea dispozitiv, trebuie prîndit momentul micţiunii pentru a putea „prinde" proba într-un flacon cu gura largă. Micţiunea la copilul mic putînd fi declanşată de stimuli externi, recoltarea probei de urină se va face înainte de a supune copilul altor manipulări: injecţii ş.a.

Recoltarea prin aspiraţie suprapubiană. Recoltarea urinii prin cateterism trebuie evitată ori de cîte ori este posibil, chiar la femeie, din cauza riscului însămînţării bacteriene a vezicii. Aspiraţia suprapubiană furnizează o probă de urină necontaminată, este uşor suportată de pacient şi îl supune la mai puţine riscuri. Este indicată la pacienţii necooperanţi (nou născuţi, sugari ş.a.) sau la pacienţii la care recolte repetate din jetul mijlociu arată bacteriurii la limită.

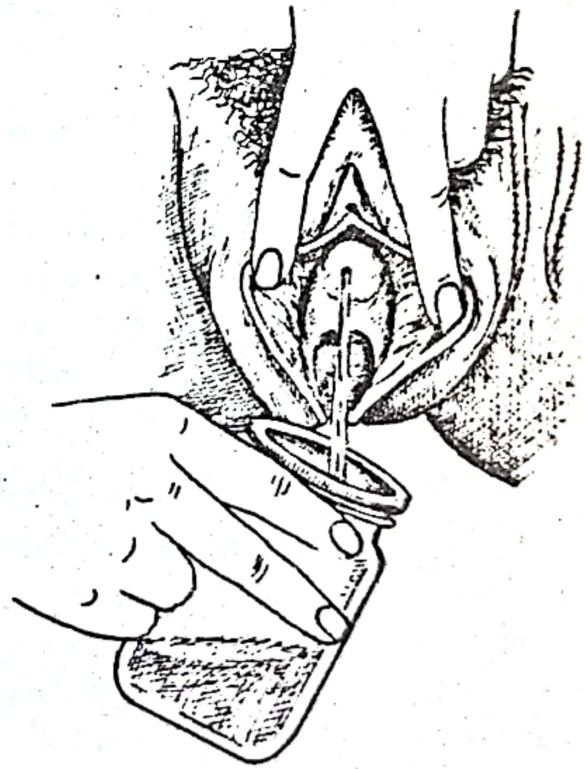
Pacientul este pregătit ca pentru o incizie chirurgicală. Punctia se face suprapubian, pe linia mediană, după anestezie locală. In prealabil pacientul este bine hidratat şi instructat să nu urineze, astfel încît vezica să fie palpabilă în momentul procedurii. Aspiraţia suprapubiană nu este posibilă la pacienţii cu capacitate vezicală redusă sau la cei cu polakiurie.



I. PACIENTA CU MIINILE SPALATE CU APA SI SAPUN, APOI USCATE CU HIRTIE DE TOALETA:
(1) CU O MINA INDEPARTEAZA LABIILE MICI SI LE MENTINE CA ATARE PE TOATA DURATA RECOLTARII;
(2) CU CEALALTA MINA STERGE FERM VULVA, IN SENS UNIC, DIN FATA SPRE SPATE, INCEPIND CU ORIFICIUL URETRAL, DE 3 ORI CU CITE UN TAMPON STERIL DE TIFON INMUIAT IN SOLUTIE 5% DE SAPUN LICHID IN APA;
(3) INFIRMIERA CLATESTE ABUNDENT CU APA CALDA STERILA (FIARTĂ) ZONA DECONTAMINATA;
(4) SE USUCA ZONA VULVARA DECONTAMINATA CU 2 TAMPOANE STERILE DE TIFON CU UTILIZARE UNICA PROCEDIND CA LA 2.



II. PACIENTA URINEAZA IN TAVA MESEI GINECOLOGICE 100 ml IN TIMP CE DEGETELE MENTIN LABIILE DEPARTATE



III. SE PRIND IN BORCAN 20 ml URINA (JETUL MIJLOCIU). PENTRU A EVITA ANTRENAREA IN PROBA A MICROBILOR DE PE TEGUMENTE: GURA BORCANULUI NU ATINGE TEGUMENTUL, BORCANUL SE RETRAGE CIT TIMP LABIILE MICI MAI SINT DEPARTATE IAR PACIENTA MAI URINEAZA.

Fig.24-3 RECOLTAREA CURATA A UNEI PROBE DE URINA PRINSA DIN JETUL MIJLOCIU LA FEMEIE

Scanned with OKEN Scanner

Recoltarea probelor de urină pentru diagnosticul ITU cu bacterii condiţionat patogene trebuie făcută după minimum 3 ore de la micţiunea anterioară, interval în care bacteria infectantă se poate multiplica în urina vezicală pînă la valori care o diferenţiază uşor de contaminanţii uretrali.

Probele de urină pentru diagnosticul ITU prin bacterii patogene, fungi sau virusuri se recoltează tot din jet mijlociu, cu aceleaşi precauţii. Cantitatea de urină necesară pentru un examen corect în vederea depistării bacteriilor patogene (bacilul tuberculozei, bacilul tific ş.a.) este de ~ 5o ml. Este o practică greşită aceea de a colecta urina din 24 ore pentru diagnosticul tuberculozei renale: contactul prelungit cu urina este nociv pentru bacilul tuberculozei, iar contaminarea masivă a probei obligă la o decontaminare drastică (⟶ 31.3.), de asemenea nocivă pentru patogenul infectant. Sansele de depistare a bacilului tuberculozei în urină cresc dacă se examinează 3 probe succesive recoltate la intervale de 1-2 zile.

24.2.2. <u>Transportul probelor de urină</u>

Probele de urină trebuie examinate în maximum o oră după recoltare. Dacă acest interval nu poate fi respectat, imediat după recoltare şi pe toată durata pînă la examinare, proba se refrigerează la 4°C. Examenul probelor refrigerate poate fi temporizat cîteva ore. In buletinul de analiză a urinii este obligator de consemnat ora recoltei

24.2.3. <u>Examenul citobacterioscopic al urinii</u>

Din proba de urină omogenizată prin agitare se face

- numărarea leucocitelor în camera Fuchs-Rosenthal,
- un frotiu (1 picătură de ~o,o2 ml depusă pe lamă şi lăsată să se usuce) care se colorează Gram.

Prezenţa a >1o leucocite/mm^3 semnifică cu certitudine piuria. Prezenţa a ⩾1 bacterie/cîmp microscopic IU semnifică cu certitudine de 9o% o bacteriurie >10^5UFC/ml.

Prezenţa pe frotiul Gram a celulelor epiteliale scuamoase sau/şi a bacteriilor aparţinînd unor variate categorii microscopice, în special bacili gram-pozitivi, semnifică o contaminare masivă a probei. Asemenea probe nu se examinează în continuare şi se anunţă medicul care a solicitat analiza: „Probă contaminată, improprie pentru examenul bacteriologic cantitativ. A se repeta re-

colta".

In diagnosticul tuberculozei renale examenul microscopic al frotiului Ziehl-Neelsen din sedimentul urinar are o valoare cu totul limitată din cauza posibilităţilor de contaminare a urinii cu micobacterii saprofite.

24.2.4. Urocultura cantitativă

(1) Din proba de urină bine omogenizată se face o diluţie 10^{-2} (lo ml soluţie salină izotonă sterilă + o,1 ml urină).

(2) Cîte o,1 ml din diluţia de urină 10^{-2} se etalează cu atenţie pe întraga suprafaţă a unei plăci cu geloză-sînge şi a unei plăci cu agar Mac Conkey.

(3) Se incubează plăcile aerob la 37°C.

(4) A doua zi se numără coloniile dezvoltate.

Nr.UFC/ml urină = Σ coloniilor de pe o placă x 10^3

Prezenţa a $\geqslant 10^5$UFC/ml urină în probă din jet mijlociu alături de piurie semnifică existenţa ITU. Prezenţa izolată a bacteriuriei semnificative fără piurie semnifică simpla colonizare a urinii.

Pentru bacteria infectantă se efectuează antibiograma.

Prezenţa a $<10^4$UFC/ml urină din jet mijlociu ţine de contaminarea probei.

Prezenţa a 10^4-10^5 bacili gram-negativi/ml urină poate fi urmarea ITU. Repetarea urocultului va confirma sau va infirma aceasta. Bacteriuriile de acest ordin de mărime cu stafilococ sau Candida sînt semnificative*) .

Pentru probele de urină recoltate prin puncţie suprapubiană simpla prezenţă a bacteriilor, alături de piurie, semnifică ITU.

Creşterea diurezei la pacienţii cu ITU sau administrarea de substanţe antimicrobiene cu eliminare urinară scad numărul de bacterii/ml urină. Este un aspect de care trebuie să se ţină seama în interpretarea rezultatelor urocultului cantitative.

Interpretarea examenului bacteriologic cantitativ pe probe seriate pentru localizarea infecţiei la nivelul căilor urinare inferioare (uretră, vezică, prostată):

- Numărul UFC/ml în proba 1 mai mare decît în proba 4, cu proba 2 sterilă = uretrită;
- numărul UFC/ml în probele 3 şi 4 mai mare decît în proba 1

*) Vezi nota de la subsolul pag.

= prostatită;

- numărul UFC/ml în proba 3 mai mare decît în proba 4 = prostatită cronică.

Pentru depistarea prostatitei atunci cînd proba 2 este pozitivă se administrează 2-3 zile antibioterapie activă în urină după care se face o nouă recoltă seriată. In ordinea frecvenţei, prostatitele sînt determinate de bacilii gram-negativi, în special E.coli, gonococ, Candida, Trichimonas.

Bacteriile patogene sînt căutate prin metode speciale de însămînţare (medii selective, medii speciale) şi inoculare a sedimentului urinar, metode pe care laboratorul, anterior avizat, le execută la indicaţia specială a clinicii: suspiciunea de tuberculoză renală, leptospiroză, bruceloză, febră tifoidă ş.a.

Examenul virologic al urinii. La pacienţii cu cistită hemoragică şi examen bacteriologic negativ al urinii se pot face investigaţii pentru depistarea adenovirusurilor

BIBLIOGRAFIE

Barry A.L., Smith R.B., Turck M., Gavan T.L. (1975): Laboratory diagnosis of urinary tract infections. CUMITEH 2, Amer. Soc.Microbiol., Washington, pp.1-8.

Brumfitt W. (1965): Urinary cell counts and their value. J.Clin.Path., 18:55o.

Buiuc D. (198o): Posibilităţile şi locul investigaţiei bacteriologice în diagnosticul infecţiilor neonatale ale căilor urinare. Rev.Med.Chir.(Iaşi), 84:158.

Buiuc D. (1977): Aprecierea performanţelor calitative ale unei metode propuse pentru standardizarea examenului bacteriologic şi antibiogramă în infecţia urinară. Rev.Med.Chir. (Iaşi), 81:513.

Duca E., Buiuc D. (1976): Aportul laboratorului de microbiologie în investigaţia reno-urinară. Examenul bacteriologic al urinii. Bacteriol.Virusol.Parazitol.Epidemiol., 21:193.

Kass E.H. (1978): The significance of bacteriuria. J.Infect.Dis., 138:546.

Reinarz J.A., Craig J.A. (1978): Nosocomial infections. Urinary tract infections. CIBA Clinical Symposia, 3o:7-9.

Scanned with OKEN Scanner

25. EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL EXSUDATULUI NASOFARINGIAN IN DIAGNOSTICUL INFECTIILOR TRACTUSULUI RESPIRATOR SUPERIOR

DUMITRU T. BUIUC

25.1. Aspecte generale

25.1.1. Condiţia microbiologică a mucoaselor tractusului respirator superior (TRS) şi cavităţilor conecte

Normal mucoasele nasală, nasofaringiană, faringiană şi bucală sînt populate de un număr considerabil de microorganisme aparţinînd unor diverse specii comensale, anaerobe şi aerobe, nepatogene, accidental sau condiţionat patogene (fig.26-1). Dintre virusuri, numai virusul herpetic poate fi considerat un constituient al microbiotei indigene de la acest nivel fiind izolat de la 5% din adulţii normali.

Mucoasele sinusurilor paranasale şi urechea medie sînt zone practic sterile.

25.1.2. Etipatogenia infecţiilor TRS

Infecţiile TRS (rinite, angine, laringite) sînt determinate cel mai frecvent de virusuri. Infecţiile bacteriene la aceste nivele evoluează ca infecţii primare sau ca infecţii secundare infecţiilor virale ori altor condiţii care scad rezistenţa antiinfecţioasă a organismului (boli de sînge, iritaţii chimice, deshidratarea excesivă a mucoaselor ş.a.). Infecţiile micotice evoluează ca infecţii secundare.

> Pentru următoarele specii ale microbiotei indigene nu s-a demonstrat nici o implicare etiologică în infecţii ale TRS:
>
> streptococii α-hemolitici, Veillonella,
> Staphylococcus epidermidis, bacili difterimorfi
> Neisseria „nepretenţioase",

> Dintre infecţiile bacteriene primare, pe primul loc ca frecvenţă şi importanţă a complicaţiilor se situează anginele determinate de Streptococcus pyogenes.

Toxiinfecţia difterică, frecventă altădată, astăzi este rară.

Epiglotita acută determinată de Haemophilus influenzae tip b este o infecţie bacteriemică a copilului mic (6 luni-2 ani), rară la adult. Faringita cu Neisseria gonorrhoeae apare în circumstanţe epidemiologice particulare.

Infecţiile secundare ale TRS şi cavităţii bucale sînt determinate de unii comensali condiţionat patogeni: Candida albicans, asociaţia Borrelia vincenti + Fusobacterium fusiforme, posibil stafilococul auriu.

Sinusitele şi otitele medii acute sînt determinate de virusuri, de pneumococi, S.pyogenes şi H.influenzae. In schimb, cele cronice recunosc o etiologie mai variată care include atît bacterii aerobe cît şi anaerobe.

Examenul microbiologic al exsudatului faringian se efectuează pentru

- diagnosticul anginelor streptococice care, spre deosebire de cele virale, pot fi şi trebuie tratate cu penicilină;
- confirmarea diagnosticului clinic de toxiinfecţie difterică;
- depistarea purtătorilor de S.pyogenes;
- diagnosticul unor infecţii respiratorii virale (gripală, adenovirală, enterovirale).

Examenul bacteriologic al exsudatului nasofaringian se efectuează pentru

- depistarea purtătorilor de S.pyogenes;
- depistarea purtătorilor de Neisseria meningitidis, Corynebacterium dyphtheriae, Bordetella pertussis, H.influenzae, bacterii care se găsesc mai frecvent la acest nivel decît în nas şi faringe;
- diagnosticul unor infecţii respiratorii virale (cu rinovirusuri, cu virusul respirator sinciţial)

Examenul bacteriologic al exsudatului nasal se efectuează pentru depistarea purtătorilor de stafilococ auriu (în izbucniri epidemice de infecţii nosocomiale stafilococice) şi S.pyogenes.

Este o practică greşită aceea de a examina exsudatul nasal sau nasofaringian pentru a depista infectanţii sinusurilor paranasale sau ai urechii medii. Pentru diagnosticul sinusitelor sînt indicate probe obţinute prin punctia sinusului sau chiuretajul mucoasei sinusale. Examenul bacteriologic, justificat în general

Epiglotita acută determinată de Haemophilus influenzae tip b este o infecţie bacteriemică a copilului mic (6 luni-2 ani), rară la adult. Faringita cu Neisseria gonorrhoeae apare în circumstanţe epidemiologice particulare.

Infecţiile secundare ale TRS şi cavităţii bucale sînt determinate de unii comensali condiţionat patogeni: Candida albicans, asociaţia Borrelia vincenti + Fusobacterium fusiforme, posibil stafilococul auriu.

Sinusitele şi otitele medii acute sînt determinate de virusuri, de pneumococi, S.pyogenes şi H.influenzae. In schimb, cele cronice recunosc o etiologie mai variată care include atît bacterii aerobe cît şi anaerobe.

Examenul microbiologic al exsudatului faringian se efectuează pentru

- diagnosticul anginelor streptococice care, spre deosebire de cele virale, pot fi şi trebuie tratate cu penicilină;
- confirmarea diagnosticului clinic de toxiinfecţie difterică;
- depistarea purtătorilor de S.pyogenes;
- diagnosticul unor infecţii respiratorii virale (gripală, adenovirală, enterovirale).

Examenul bacteriologic al exsudatului nasofaringian se efectuează pentru

- depistarea purtătorilor de S.pyogenes;
- depistarea purtătorilor de Neisseria meningitidis, Corynebacterium dyphtheriae, Bordetella pertussis, H.influenzae, bacterii care se găsesc mai frecvent la acest nivel decît în nas şi faringe;
- diagnosticul unor infecţii respiratorii virale (cu rinovirusuri, cu virusul respirator sincitial)

Examenul bacteriologic al exsudatului nasal se efectuează pentru depistarea purtătorilor de stafilococ auriu (în izbucniri epidemice de infecţii nosocomiale stafilococice) şi S.pyogenes.

Este o practică greşită aceea de a examina exsudatul nasal sau nasofaringian pentru a depista infectanţii sinusurilor paranasale sau ai urechii medii. Pentru diagnosticul sinusitelor sînt indicate probe obţinute prin puncţia sinusului sau chiuretajul mucoasei sinusale. Examenul bacteriologic, justificat în general

numai în otitele medii cronice, trebuie făcut pe probe de puroi recoltate prin timpanocenteză.

25.2. Recoltarea şi transportul probelor

Exsudatul faringian se recoltează cu tamponul. Faringele trebuie bine expus şi iluminat. Pacientul ţine gura larg deschisă, limba este apăsată şi imobilizată cu spatula. Se şterg cu tamponul ferm, fără a brusca, ambele amigdale, peretele posterior al faringelui şi orice arie congestivă, cu exsudat purulent sau ulceraţii. In prezenţa falselor membrane se insistă la limita dintre falsa membrană şi mucoasă cu insinuarea tamponului sub falsa membrană. Tamponul nu trebuie să atingă limba sau să se contamineze cu salivă. Această recoltare poate declanşa reflex un acces de tuse. De aceea este indicat ca persoana care recoltează exsudatul faringian să se protejeze cu mască de tifon.

Exsudatul nasofaringian se recoltează tamponul, cel mai uşor pe cale nasală. Se utilizează tampon confecţionat din aplicator de sîrmă crom-nichel cu lungimea de 2o cm şi Ø de 1 mm. Una din extremităţi este îndoită asupra ei însăşi, înmuiată în colodiu şi înfăşurată strîns cu vată cu fibra lungă pentru a forma tamponul propriu-zis. Extremitatea liberă este îndoită în buclă pentru a facilita manipularea. Se sterilizează introdus în tub de 16/16omm.

Capul pacientului este imobilizat şi tamponul introdus prin nară şi împins cu blîndeţe de-a lungul planşeului nasal pînă atinge peretele posterior al nasofaringelui. Este lăsat cîteva secunde pe loc, apoi rotit uşor pentru a-l încărca cu exsudat şi retras.

Tamponul nasal pentru depistarea portajului de S.aureus: se şterge pe rînd vestibulul foselor nasale cu tamponul umectat în soluţie salină izotonă.

Imediat după recoltare:

- Tampoanele destinate examenului bacteriologic sînt introduse în tub, etichetate şi expediate la laborator. Dacă examenul nu poate fi efectuat în interval de 1-2 ore după recoltare, se introduc în mediu de transport şi se refrigerează. Pentru izolarea meningococilor şi gonococilor recomandăm însămînţarea probelor imediat după recoltare pe mediu selectiv preîncălzit la 37°C.

- Pentru izolarea virusurilor, dată fiind etiologia variată a infecţiilor TRS, este indicat ca tamponul nasofaringian şi cel

faringian recoltate de la acelaşi pacient să fie descărcate într-un singur flacon cu mediu de transport.

Buletinul de analiză trebuie să consemneze în termeni precişi examenul solicitat: bacteria patogenă care se urmăreşte (streptococ β-hemolitic, meningococ, bacil difteric ş.a.) precum şi diagnosticul clinic. Intr-un fel este condus examenul exsudatului faringian pentru izolarea streptococilor β-hemolitici şi în altul pentru izolarea bacililor difterici ş.a.

25.3. Examenul bacteriologic al exsudatelor de la nivelul căilor respiratorii superioare

25.3.1. Examenul bacteriologic de rutină al exsudatului faringian Diagnosticul anginelor streptococice

Examenul direct microscopic. Un microbiolog experimentat poate confirma angina streptococică cu certitudine de ~70% pe baza prezenţei în frotiul Gram a cocilor sferici gram-pozitivi izolaţi sau în perechi asociaţi polimorfonuclearelor.

Cultura

Prima zi. Tamponul este epuizat pe o placă cu geloză-sînge care se incubează peste noapte la 37°C în borcan cu lumînare. Incubarea anaerobă sau în condiţii de tensiune redusă a O_2 (care se poate obţine prin turnarea peste suprafaţa însămînţată a unui strat de geloză transparentă) măreşte proporţia rezultatelor pozitive prin evidenţierea tulpinilor de S.pyogenes care nu produc streptolizină S şi care în culturile aerobe formează colonii α hemolitice care se confundă cu cele ale streptococilor viridans.

A doua zi se examinează cu atenţie plăcile în lumină transmisă şi în lumină reflectată. Se urmăreşte prezenţa şi numărul coloniilor β-hemolitice. Dacă sînt prezente, se procedează la identificarea grupului antigenic fie prezumtiv prin testul de sensibilitate la bacitracină, fie prin reacţia de precipitare inelară.

In cazul izolării unui număr redus de colonii β-hemolitice, examenul culturii la lupa stereoscopică poate diferenţia între streptococii infectanţi (colonii mucoide sau matt) şi cei de portaj (colonii glossy).

Pentru comunicarea rezultatelor recomandăm următorii termeni:

- prezent streptococ β-hemolitic grup A sau non grup A (dacă s-a făcut determinarea grupului): numeroase colonii sau cîteva colonii, după caz;

- floră bacteriană normală.

Insistăm asupra termenului de „floră normală" şi nu opiniem pentru nominalizarea speciilor respective (streptococ viridans sau streptococi α-hemolitici, neisserii „nepretenţioase" ş.a.) deoarece poate fi o sursă de interpretări eronate, din partea celor neavizaţi, dăunătoare pentru pacient.

Se va comunica de asemenea orice dezechilibru constatat în microbiota normală a faringelui: predominanţa stafilococilor aurii, a bacililor gram-negativi, levuri ş.a. La pacienţii cu angine virale ca şi la cei normali microbiota aerobă a faringelui şi nasofaringelui este predominată de streptococi viridans şi neisserii „nepretenţioase".

25.3.2. Izolarea altor bacterii patogene din exsudatul de la nivelul căilor respiratorii superioare

Pentru izolarea H.influenzae se epuizează tamponul pe o placă cu geloză-şocolat. Coloniile de H.influenzae se pot izola selectiv în zona de inhibiţie a unei rondele cu bacitracină depusă pe suprafaţa mediului imediat după însămînţare.

Pentru izolarea meningococului sau gonococului epuizarea tamponului nasofaringian se face pe placă cu agar Mueller-Hinton suplimentat nutritiv şi selectiv*).

Confirmarea bacteriologică a anginei difterice. Diagnosticul clinic este cel care dictează terapia specifică în difterie. Laboratorul de bacteriologie nu face decît să confirme sau să infirme acest diagnostic într-un interval în care actul terapeutic este deja consumat.

Se recoltează 3 tampoane de la limita falsei membrane.

Examenul direct microscopic. Cu primul tampon se efectuează extemporaneu un frotiu. Se colorează cu albastru de metilen Loeffler sau altă coloraţie specială pentru depistarea granulaţiilor metacromatice. Prezenţa bacililor corineformi cu granulaţii metacromatice polare întăreşte suspiciunea de difterie. Absenţa lor nu exclude însă acest diagnostic.

Cultura

Prima zi. Al doilea tampon se epuizează pe o placă cu mediu Tinsdale (mediu selectiv cu telurit de potasiu) şi pe o placă cu geloză-sînge. Însămînţarea în paralel pe geloza-sînge se impune

*) Selectiv prin adaus de vancomicină, colimicină şi nistatină.

din două motive:

- controlează calitatea recoltei. Pemediu selectiv poate să nu apară o cultură. Dacă lipseşte cultura şi pe placa cu geloză-sînge, atunci recolta este necorespunzătoare.

- Unele angine cu S.pyogenes pot simula difteria. In acest caz placa cu geloză-sînge lămureşte diagnosticul, ceea ce nu poate să facă mediul selectiv cu telurit de potasiu.

Al treilea tampon este însămînţat pe mediu de îmbogăţire OCST (ou-cistină-telurit de potasiu).

Mediile însămînţate se incubează peste noapte la 37°C.

A doua zi. Pe mediu Tinsdale

- sînt prezente colonii negre cu halou negru. Acestea sînt repicate pe mediu Loeffler şi într-un tub cu bulion infuzie. In seara aceleeaşi zile poate fi făcut un frotiu din cultura pe mediu Loeffler.

- Coloniile negre cu halou negru lipsesc. Se reincubează plăcile pentru alte 24 ore. Se face repicarea de pe mediu de îmbogăţire pe mediu selectiv şi se urmăreşte în acelaşi mod.

A treia zi se procedează la identificarea biochimică a izolaţilor. Dacă s-a izolat bacilul difteric,

a patra zi se procedează la testarea toxigenezei i n v i v o sau i n v i t r o (fig.5-5).

Diagnosticul anginei Vincent. Această infecţie evoluează cu leziuni pseudomembranoase sau ulcero-necrotice la nivelul gurii sau faringelui. Cu tamponul recoltat de la nivelul leziunii se efectuează extemporaneu un frotiu care se colorează Gram. Se urmăreşte prezenţa spirochetelor (B.vincenti) şi a bacililor fusiformi gram-negativi (F.fusiforme).

Diagnosticul stomatitelor micotice, afecţiuni mai frecvente la nou născuţi şi sugari. Examenul direct microscopic între lamă şi lamelă a exsudatului de la nivelul membranelor albe, slab aderente de pe mucoasa obrazului, a palatului ş.a., caracteristice acestei afecţiuni, depistează numeroase levuri. Candida albicans poate fi izolată şi identificată în cultură pe mediul Sabouraud (→ 19.)

25.4. Examenul virologic în infecţiile TRS (→ 36.)

26. EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL SPUTEI IN DIAGNOSTICUL INFECTIILOR TRACTUSULUI RESPIRATOR INFERIOR

DUMITRU T. BUIUC

26.1. Aspecte generale

26.1.1. Etiopatogenia infecţiilor tractusului respirator inferior

Infecţiile tractusului respirator inferior (TRI) sînt determinate de virusuri, bacterii şi, mai rar, de fungi sau protozoare Majoritatea acestor infecţii sînt infecţii aerogene şi numai o proporţie redusă, din cele bacteriene, sînt hematogene (metastaze septice pulmonare în cursul septicopioemiilor).

Virusurile implicate în infecţiile TRI sînt: virusul respirator sinciţial şi virusurile paragripale (în particular la copii sub 3 ani), adenovirusurile şi virusurile gripale; mai rar intervin picornavirusuri şi herpesvirusuri.

Bacteriile implicate în infecţiile TRI sînt:

(i) de cele mai multe ori comensali condiţionat patogeni ai căilor respiratorii superioare

Streptococcus pneumoniae,
Haemophilus influenzae,
Mycoplasma pneumoniae,
Klebsiella pneumoniae,
Staphylococcus aureus,
Escherichia coli,
Proteus spp,
Pseudomonas aeruginosa ş.a.

(ii) mai rar bacterii patogene

Mycobacterium tuberculosis,
Bordetella pertussis,
B.parapertussis,
Chlamydia psittaci,
Streptococcus pyogenes,
Bacillus anthracis,
Yersinia pestis

Infecţia bacteriană acută a TRI prin bacterii condiţionat patogene apare cel mai frecvent ca o complicaţie a infecţiilor virale de la acest nivel.

Cînd focarul infecţios evoluează în lumenul bronşic sau alveolar (bronşite acute, pneumonii lobare şi bronhopneumonii) microbul infectant este prezent şi poate fi depistat în exsudatul bronşic sau alveolar. Cînd are însă o evoluţie interstiţială (tuberculoză pulmonară, abcese pulmonare), microbul infectant apare în secreţia bronşică numai după deschiderea focarului infec-

ţios în lumenul bronşic.

Pneumoniile bacteriene acute sînt infecţii bacteriemice: bacteria infectantă poate fi izolată în hemocultură în cursul primelor zile de boală. Aceste pneumonii se pot complica cu empieme pleurale, cînd bacteria infectantă poate fi depistată în exsudatul pleural.

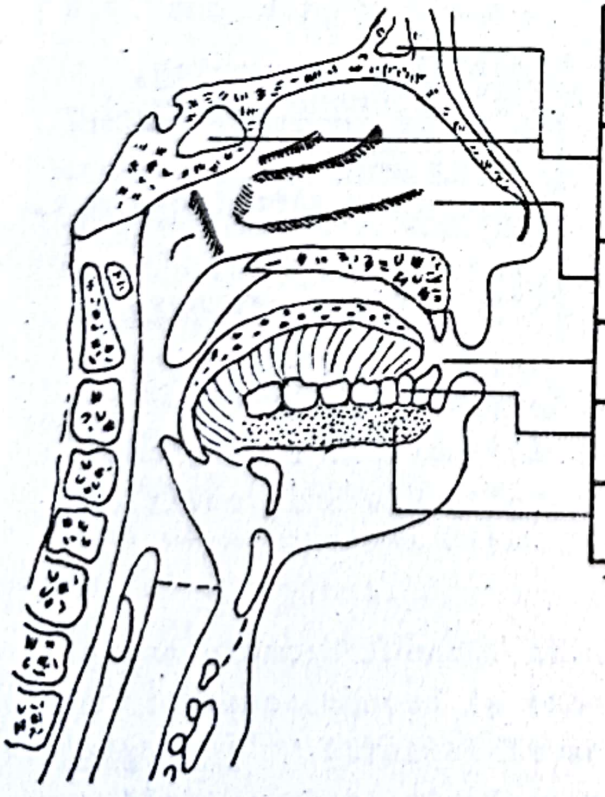
Sputa este reprezentată de secreţiile traheobronşice expectorate în cursul unui acces de tuse.

Acumularea de secreţii bronşice şi expectoraţia nu sînt apanajul exclusiv al infecţiilor bronhopulmonare. Ele apar şi în alte circumstanţe patologice:

- afecţiuni alergice ale căilor respiratorii,
- bronşite cronice.

26.1.2. Condiţia microbiologică a exsudatelor de la nivelul TRI

Mucoasa bronşică normală este practic sterilă. Sputa este însă un produs patologic care se contaminează întotdeauna cu microbiota orofaringiană (fig.26-1).



Zone si secreţii	Nr.organisme/ml/cmp/g	
	aerobe	anaerobe
Mucoasa sinusurilor paranasale şi urechea medie	Practic sterile	
Spălătură nasală	$10-10^4$	10^2-10^5
Salivă	10^7-10^8	10^8-10^9
Suprafaţa dinţilor	10^6	10^6
Raclat gingival	10^7	10^7

Fig.26-1 Microbiota căilor aero-digestive superioare (relaţii cantitative): sursa de contaminare a probelor de spută

Nici aspiraţia prin bronhoscop nu protejează exsudatul bronşic de contaminarea cu flora orofaringiană.

Aspiraţia traheo-bronşică prin puncţie transtraheală subglotică şuntează eficient orofaringele şi poate furniza un eşantion de exsudat brohoalveolar necontaminat.

Flora de contaminare normală a sputei include:

Constant	Variabil şi cantităţi reduse
streptococi viridans, Neisseria „nepretenţioase, Branhamella catarrhalis, stafilococi, anaerobi nesporulaţi	pneumococi (de obicei R), Haemophilus spp, streptococi β-hemolitici, enterococi, Enterobacteriaceae (mai frecvent E.coli şi Klebsiella), Candida albicans, Pseudomonas aeruginosa

La pacienţii trataţi cu antibiotice contaminarea sputei cu bacili gram-negativi, stafilococ auriu şi levuri poate fi mai importantă ca urmare a colonizării căilor aero-digestive superioare cu aceste microorganisme.

> Pentru diagnosticul etiologic al infecţiilor bronhopulmonare trebuie examinat microbiologic exsudatul bronhoalveolar.
> In pneumoniile bacteriene acute hemocultura practicată în primele zile de boală este foarte utilă. De asemenea, examenul bacteriologic al exsudatului pleural sînd acesta există.

26.2. Recoltarea şi transportul probelor

26.2.1. Recoltarea sputei

După ce îşi clăteşte bine gura cu apă fiartă şi răcită, pacientul tuşeşte profund şi expectorează într-un borcan steril de 100-250 ml prevăzut cu capac. O probă de 1-3 ml este suficientă pentru examenul microbiologic.

La pacienţii cu tuse productivă recomandăm ca proba să se recolteze în prezenţa medicului sau a sorei.

La pacienţii cu tuse slab productivă proba se recoltează dimineaţa la deşteptare (exsudatul bronşic acumulat peste noapte)

26.2.2. Recoltarea exsudatului bronşic pe tampon laringian

La pacienţi care nu expectorează (copii ş.a.) se recoltează pe tampon laringian exsudatul bronşic proiectat în cursul tusei pînă la acest nivel.

Tamponul laringian este confecţionat dintr-un aplicator de sîrmă de aluminiu lung de 2o cm şi cu Ø de 2 mm. In momentul în care se scoate din tubul de sterilizare este cudat în unghi de 120° la 4-5 cm de extremitatea care suportă tamponul de vată. Recoltarea: limba este imobilizată cu o spatulă şi tamponul umectat cu soluţie salină izotonă este introdus peste baza limbii. Cînd partea lungă a aplicatorului stă de-a lungul limbii, tamponul este în laringe. Dacă în acest moment pacientul este stimulat să tuşească, secreţii din trahee şi laringe se depun pe tampon.

Este o practică greşită aceea de a încerca, la pacienţi care nu expectorează, diagnosticul infecţiilor TRI cu bacterii condiţionat patogene prin examinarea unei probe de exsudat nasofaringian. Excepţie fac infecţiile virale ale TRI pentru diagnosticul cărora o probă de exsudat nasofaringian poate fi utilă.

Pentru diagnosticul cazurilor suspecte de tu convulsivă tamponul introdus în nasofaringe pe cale nasală este lăsat pe loc pe parcursul unui acces de tuse provocată. La pacienţii la care nu se reuşeşte recoltarea pe tampon, se plasează la 1o cm de gură o placă cu mediu Bordet-Gengou descoperită în cursul unui acces de tuse. Rezultatele sînt însă mai slabe decît în cazul recoltării pe tampon.

26.2.3. Pentru diagnosticul bacteriologic al tuberculozei pulmonare se recoltează cîte o probă de spută matinală 3 zile consecutiv.

La pacienţii care nu expectorează se recoltează cîte un tampon laringian în 3 zile consecutiv sau se recoltează spălătura gastri . Probele de spălătură gastrică trebuie neutralizate imediat cu soluţie 1o% carbonat de sodiu în prezenţa unui indicator de pH.

La pacienţii cu tuse slab productivă se poate încerca stimularea secreţiilor bronşice prin aerosoli calzi cu soluţie 10% glicerol şi 15% clorură de sodiu. Metoda este utilă şi pentru recoltarea probelor în infecţii fungice ale TRI.

Probe utile pentru examenul bacteriologic şi micologic la pacienţii cu infecţii cronice ale TRI pot fi obţinute şi prin spălătură bronşică în cursul bronhoscopiei.

Probele de spută trebuie transportate, imediat după recoltare, la laborator unde sînt examinate fără întîrziere. Refrigerarea

poate fi nocivă pentru unele dintre bacteriile infectante ale TRI (N.meningitidis, H.influenzae).

Rezultatele examenului bacteriologic şi micologic în diagnosticul infecţiilor TRI depind direct de cantitatea exsudatului bronhoalveolar prezent în probele de spută examinate. Reducerea contaminării orofaringiene a probelor de spută este o condiţie esenţială în diagnosticul infecţiilor TRI cu bacterii condiţionat patogene şi, fără a fi o condiţie critică, ameliorează izolarea micobacteriilor sau fungilor.

Regretabil, dar încă frecvent examenul microbiologic în infecţiile TRI eşuează din cauza probelor necorespunzător recoltate: pacienţi neinstructaţi îşi autorecoltează nesupravegheaţi proba care este lăsată ore întregi pe noptiera bolnavului (sau sub aceasta), interval în care contaminanţii orofaringieni se multiplică.

26.3. Examenul bacteriologic al sputei în infecţiile bronhopulmonare acute

26.3.1. Decontaminarea îndepărtează din proba de spută saliva.

In cutii Petri, se pregătesc 3 băi cu ~20 ml soluţie salină izotonă sterilă fiecare. Se prelevă din probă un fragment fibrinopurulent sau sanguinolent şi se spală succesiv în cele 3 băi, câte un minut în fiecare baie. Manipularea se face cu o ansă cu firul gros.

26.3.2. Examenul direct microscopic

De pe un fragment fibrino-purulent din ultima baie de spălare, excesul de lichid este absorbit pe hîrtie de filtru şi se fac 3 frotiuri, care se colorează

- cu albastru de metilen sau, mai bine, May-Grünwald-Giemsa pentru urmărirea reacţiei celulare;
- Gram pentru urmărirea bacteriilor;
- Ziehl-Neelsen pentru urmărirea bacililor acido-alcoolo-rezistenţi.

26.3.2.1. Aprecierea microscopică a calităţii probei de spută

Frotiul Gram se examinează cu o mărire de 100x (→ 6.2.2.)

- Prezenţa a > 25 celule epiteliale scuamoase/cîmp microscopic 100x semnifică o contaminare masivă a probei cu secreţii oro-

faringiene (scorul calitativ „Q" rămîne $\leq +1$, indiferent de numărul polimorfonuclearelor observate). Aceste probe sînt improprii examenului bacteriologic. Se comunică imediat acest rezultat şi se solicită o nouă probă recoltată cu mai multe precauţii.

- Prezenţa a < 25 celule epiteliale scuamoase/cîmp microscopic 100x şi a unei importante reacţii inflamatorii cu polimorfonucleare şi macrofage alveolare semnifică o probă reprezentativă pentru focarul infecţios bronhopulmonar, cu atît mai reprezentativă cu cît numărul celulelor epiteliale scuamoase este mai mic

26.3.2.2. Examenul bacterioscopic

In infecţiile acute ale TRI asocierea cu celulele inflamatorii a bacteriilor pneumococoide, hemofiloide, neisserioide şi a bacililor gram-negativi în cantităţi >1o organisme/cîmp microscopic IU semnifică puternic implicarea etiologică a acestor bacterii.

In infecţiile cronice ale TRI examenul bacterioscopic identifică infectantul numai cînd acesta are caractere microscopice particulare, deosebite de cele ale contaminanţilor sputei decelabili microscopic. De exemplu, bacili acido-alcoolo-rezistenţi, Actinomyces (→16.)

26.3.3. Sputocultura

In vederea cultivării probele de spută se omogenizează. Mai multe fragmente fibrino-purulente sînt trecute din ultima baie de spălare într-un flaconaş cu perle de sticlă şi se agită adăugînd cu picătura un volum aproximativ egal din soluţia o,5% de N-acetil-cisteină sterilă.

Prima zi. Din proba decontaminată şi omogenizată, se epuizează semicantitativ o ansă pe cîte o placă cu geloză-sînge şi geloză-şocolat. Rondele cu optochin depuse pe placa cu geloză-sînge facilitează identificarea prezumtivă a pneumococilor în cultura primară. Rondele cu bacitracină depuse pe placa cu geloză-şocolat favorizează izolarea H.influenzae.

Se incubează în borcan cu lumînare la 37°C.

A doua zi se examinează plăcile. Este identificată ca infectantă bacteria izolată predominant şi în cantitate mare (+++ sau ++ , →3.), care aparţine aceleeaşi categorii microscopice cu

bacteria asociată semnificativ celulelor inflamatorii pe frotiul Gram din spută.

Se efectuează antibiograma infectantului.

Rolul etiologic al unor condiţionat patogeni izolaţi în cantităţi reduse (+) şi pentru care frotiul Gram nu a demonstrat o asociere semnificativă cu celulele inflamatorii este dubios.

26.3.4. Inocularea la şoarece. Dacă frotiul Gram din spută demonstrează asocierea cu celulele inflamatorii a unor bacterii pneumococoide sau bacili gram-negativi capsulaţi, proba poate fi inoculată intraperitoneal la şoarece în vederea izolării şi identificării pneumococului respectiv K.pneumoniae.

26.4. Examenul bacteriologic în supuraţiile pulmonare (⟶ 23.)

26.5. Examenul virologic în infecţiile TRI (⟶ 36.)

BIBLIOGRAFIE

Buiuc D., Burcoveanu C. (1982): Confruntări cantitative între examenul bacterioscopic şi sputocultură. Comunicare - A1 III-lea Congres naţional de microbiologie, Bucureşti, 23-25 septembrie 1982.

Buiuc D., Duca E. (1978): Posibilităţile laboratorului de microbiologie clinică în investigarea infecţiilor tractusului respirator inferior. Rev.Med.Chir.(Iaşi), 82:353.

x x x : Examenul bacteriologic şi citologic în infecţiile tractusului respirator inferior. Metoda standard aprobată de Comisia pentru standardizare a Academiei de ştiinţe medicale. Rev.Med.Chir.(Iaşi) 1978, 82:517.

27. DIAGNOSTICUL MICROBIOLOGIC AL INFECTIILOR GENITALE LA FEMEIE

GABRIELA C. COMAN

27.1. Condiţia microbiologică normală a tractusului genital feminin

Căile genitale la femeie cuprin două zone distincte: (i) o zonă contaminată (vulvă, vagin, exocol) şi (ii) o zonă normal sterilă (uter, trompe). Endocolul uterin este o zonă de tranziţie.

Microbiota vulvei este asemănătoare cu cea din zona perineală şi perianală.

Microbiota vaginală, în primele săptămîni după naştere şi din perioada pubertară pînă la menopauză, este dominată de specii de Lactobacillus cunoscute şi sub numele de bacili Döderlein. Prin activitatea metabolică a lactobacililor, glicogenul, depus în celulele epiteliului vaginal sub controlul hormonilor ovarieni, este descompus cu apariţia unor compuşi acizi. Se realizează astfel un pH vaginal mai mic de 5,o ce creează condiţii nefavorabile de multiplicare pentru alte specii bacteriene, inclusiv patogene. In absenţa hormonilor ovarieni sau în caz de tulburări hormonale microbiota vaginală devine extrem de variată fiind reprezentată de coliformi, specii Bacteroides şi alţi bacili gram-negativi anaerobi, stafilococi, streptococi grup B şi D, streptococi anaerobi, neisserii „nepretenţioase", specii Clostridium, treponeme comensale, specii Candida ş.a. La femeia în activitate sexuală apar în plus Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum, Gardnerella (Haemophilus) vaginalis.

Mucusul cervical, prin conţinutul său cresçut în lizozim, manifestă o importantă activitate antibacteriană contribuind la asigurarea condiţiei normal sterilè a zonelor suprajacente.

27.2. Diagnosticul microbiologic al infecţiilor de la nivelul zonei contaminate

27.2.1. Aspecte etiopatogenice. Microorganismele implicate pot fi:

1. Protozoare — Trichomonas vaginalis; Entamoeba histolytica

2. Levuri	Candida albicans
3. Bacterii	Neisseria gonorrhoeae Treponema pallidum Chlamydia trachomatis Gardnerella vaginalis Haemophilus ducreyi
4. Virusuri	Herpesvirus

Ele se pot încadra în una din următoarele două categorii:

- microorganisme înalt patogene, transmise îndeosebi pe cale sexuală (de exemplu, N.gonorrhoeae, T.pallidum, C.trachomatis) sau

- microorganisme condiţionat patogene, constituiente ale microbiotei vaginale, care devin dominante numeric în anumite circumstanţe (de exemplu, C.albicans, G.vaginalis).

T.vaginalis, C.albicans şi G.vaginalis sînt agenţii etiologici ai vulvovaginitelor la femeie. La fetiţe manifestări de vulvovaginită pot fi date de N.gonorrhoeae. In endocervicite sînt implicate N.gonorrhoeae şi C.trachomatis (serotipurile D-K). In ambele infecţii expresia clinică supărătoare pentru femeie este leucoreea.

T.pallidum, agentul etiologic al sifilisului, determină în stadiul primar al infecţiei o ulceraţie cu baza infiltrată (şancru tare), suprafaţa curată (aspect lăcuit), asociată cu adenită inghinală care nu ajunge niciodată la supuraţie. Virusul herpetic (cel mai frecvent serotip 2) realizează o leziune veziculo-ulcerativă. Cele două tipuri lezionale pot fi localizate pe organele genitale externe, exocol sau pereţii vaginului. Celelalte microorganisme incluse în tabel au fost rar sau de loc semnalate în ţara noastră.

27.2.2. Recoltarea produselor patologice se efectuează pe masă ginecologică după decontaminarea organelor genitale externe cu apă şi tampoane din vată sterile. Se examinează vulva şi, cu ajutorul valvelor sterile (fără lubrefiant), mucoasa vaginului, exocolul şi orificiul extern al colului stabilindu-se sediul şi aspectul leziunii.

In vulvovaginite se recoltează secreţia din fundul de sac vaginal posterior (zona cea mai înaltă) detaşînd-o cu marginea valvei. După înregistrarea caracterelor secreţiei (aspect, culoare, miros), se realizează cu ajutorul unei anse:

- două frotiuri care vor fi colorate cu albastru de metilen

sau Giemsa şi Gram;

- un preparat umed între lamă şi lamelă descărcînd conţinutul buclei într-o mică cantitate de soluţie salină izotonă.

La fetiţe produsul va fi recoltat de la nivelul orificiului de deschidere a vaginului.

In endocervicite se şterge succesiv cu 2-3 comprese sterile suprafaţa exocolului pentru îndepărtarea secreţiilor stagnante; se realizează apoi între valve o uşoară compresiune a colului, care va favoriza apariţia unei secreţii din endocol; se prelevă produsul cu ansa sterilă (evitînd contaminarea cu flora normală a zonelor traversate) pentru:

- efectuarea a două frotiuri colorate prin aceleaşi metode ca mai sus;

- însămînţarea extemporanee pe mediu selectiv şi neselectiv destinat cultivării gonococului (nu dispunem încă de metode accesibile pentru a cultiva în laboratorul clinic C.trachomatis). Plăcile însămînţate se trimit imediat la laborator, preferenţial în recipient cu lumînare (atmosferă cu 3-5% CO_2); utilizarea unui mediu de transport (mediul Amies) dă rezultate mai puţin satisfăcătoare. Deoarece infecţia gonococică este surprinsă de cele mai multe ori tardiv, în faza complicaţiilor de vecinătate, pentru a creşte şansele de evidenţiere a bacteriei se fac recoltări din sedii multiple: meat uretral, rect, orificiu de deschidere a glandei Bartholin.

Pentru a depista în frotiu incluziile intracitoplasmatice date de C.trachomatis este recomandată chiuretarea mucoasei endocolului.

Existenţa unei ulceraţii suspect sifilitică impune ca examinatorul să poarte pentru protecţie mănuşi din cauciuc. Pentru alte amănunte privind recoltarea probelor din leziunile suspect sifilitice → 32.3.

In caz de leziuni veziculare sau ulcerative, cînd laboratorul poate asigura diagnosticul de infecţie herpetică, se recoltează conţinutul veziculelor sau se raclează celule de la baza leziunii, bogate în virus

27.2.3. Diagnosticul microbiologic al vulvovaginitelor se rezolvă prin examen microscopic. Se urmăreşte:

- stabilirea naturii infecţioase a leucoreei diferenţiind-o de o scurgere vaginală de origine hormonală prin prezenţa de numeroase polimorfonucleare conglomerate şi a celulelor epiteliale

profunde de descuamaţie; face excepţie infecţia cu G.vaginalis în care reacţia inflamatorie este slab exprimată;

- identificarea agentului etiologic pe baza caracterelor microscopice.

Preparatul umed între lamă şi lamelă examinat cu obiectiv uscat permite aprecieri asupra reacţiei celulare şi recunoaşterea protozoarului mobil T.vaginalis (→ lucrările practice de parazitologie).

Frotiul colorat cu albastru de metilen sau Giemsa examinat cu imersia dă relaţii asupra citologiei (aspecte de detaliu) şi caracterelor morfologice ale microorganismelor. Prezenţa de:

- celule levurice ovalare sau sferice, cel mai adesea înmugurite, şi pseudomicelii cu extremităţi rotunjite permite un diagnostic de infecţie cu Candida;

- bacili scurţi care aderă în număr foarte mare la suprafaţa celulelor epiteliale pledează pentru o infecţie cu G.vaginalis;

- cocci reniformi în diplo, situaţi în citoplasma polimorfonuclearelor (celule „burate") este caracteristică în infecţia gonococică.

Frotiul colorat Gram permite în plus identificarea agenţilor etiologici după caracterele tinctoriale: gram-pozitiv (Candida) sau gram-negativ (N.gonorrhoeae, G.vaginalis).

27.2.4. Diagnosticul bacteriologic al endocervicitelor

27.2.4.1. Examenul microscopic al exsudatului din endocol relevă pe frotiul colorat cu albastru de metilen sau Giemsa numeroase polimorfonucleare în grămezi (în perioada premenstruală glera cervicală poate conţine un număr redus de polimorfonucleare, totdeauna izolate). Prezenţa de diplococi reniformi intra şi extracelulari pledează pentru etiologia gonococică; pe frotiul Gram se confirmă caracterul lor gram-negativ. In infecţia cu C.trachomatis în foarte rare cazuri este posibil ca pe frotiul colorat Giemsa să apară în citoplasma celulelor epiteliale incluzii paranucleare caracteristice. Infecţia cu C.trachomatis poate fi suspectată cînd în produsul patologic recoltat din endocol există o reacţie inflamatorie dar gonococul nu a putut fi depistat microscopic şi prin cultură.

27.2.4.2. Însămînţarea pe mediu selectiv (→11.2.) permite diag-

nosticul de infecţie gonococică în cazurile cu examen microscopic negativ. Plăcile însămînţate imediat după recoltarea produsului sînt incubate în laborator la 37°C în atmosferă umedă cu 3-5% CO_2, timp de 24 ore, eventual 48 ore.

Identificarea prezumtivă a gonococului se bazează pe caractere de cultură, aspectul coloniilor şi testul oxidazei, urmînd ca după alte 24 ore să fie posibilă identificarea definitivă prin determinarea spetrului de fermentare a zaharurilor (→ 11.2, 11.3).

27.2.5. Diagnosticul bacteriologic al infecţiei primare sifilitice (→ 32.3.)

27.3. Diagnosticul bacteriologic al infecţiilor de la nivelul zonei normal sterile

27.3.1. Aspecte etiopatogenice. Infecţiile căilor genitale superioare sînt de natură bacteriană. Pot fi implicate:

- cele mai diverse specii aerobe sau anaerobe, nesporulate sau sporulate, în majoritate constituienţi ai microbiotei vaginale. Realizează infecţii mixte de tip metrite, salpingite, pelviperitonite, septicemii, care survin în special ca urmare a avorturilor septice.

- N.gonorrhoeae şi C.trachomatis, care, transmise pe cale sexuală, determină infecţii ascendente utero-anexiale. Infecţia gonococică poate evolua bacteriemic cu localizări secundare (articulaţii, meninge, endocard).

- M.tuberculosis, consecutiv însămînţării utero-anexiale pe cale hematogenă.

27.3.2. Recoltarea produselor patologice. In metroanexite produsele optime pentru examen bacteriologic sînt reprezentate de:

- sînge obţinut prin puncţie venoasă pentru hemocultură;

- fragmente de ţesut sau puroi recoltate intraoperator.

Recoltarea, transportul şi prelucrarea probelor va ţine seama de diversitatea microorganismelor implicate, inclusiv de prezenţa anaerobilor.

Tamponul endocervical are valoare numai pentru depistarea N.gonorrhoeae şi C.trachomatis; restul bacteriilor pot fi de contaminare. Aceleaşi dificultăţi de interpretare întîmpinăm în cazul fragmentelor de mucoasă uterină obţinute prin chiuretaj terapeutic sau puroi recoltat prin puncţia fundului de sac Douglas.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru diagnosticul bacteriologic al tuberculozei genitale se pot recolta fragmente de endometru, sînge menstrual sau diferite exsudate obţinute prin puncţie; sîngele va fi imediat supus hemolizei cu apă distilată.

27.3.3. Diagnosticul bacteriologic al infecţiei postabortum sau postpartum

Hemoculturi repetate pe medii adecvate pentru cultivarea speciilor aerobe sau anaerobe permit izolarea bacteriilor infectante (→ 21.)

Examenul microscopic şi cultura semicantitativă efectuate pentru fragmente de mucoasă uterină obţinute prin chiuretaj au o valoare orientativă (produsul traversează o zonă normal contaminată).

27.3.4. Diagnosticul bacteriologic al unei salpingite rezolvate chirurgical. Fragmente de ţesut recoltate intraoperator sînt mojarate aseptic folosind o mică cantitate de soluţie salină izotonă. Se efectuează un frotiu colorat Gram şi se însămînţează produsul pe

- două plăci cu geloză-sînge, pentru incubare aerobă şi anaerobă;
- două plăci cu mediu, selectiv şi neselectiv, pentru N.gonorrhoeae.

Se procedează identic cu puroiul recoltat prin puncţie.

Intr-un procent important de cazuri se izolează gonococul, dar frecvent infecţiile sînt mixte cu participarea unor specii aerobe (coliformi) sau anaerobe (B.fragilis); unele probe pot da culturi negative (posibil infecţii cu C.trachomatis, Mycoplasma hominis sau anaerobi fastidioşi).

27.3.5. Diagnosticul bacteriologic al tuberculozei genitale (→31.)

BIBLIOGRAFIE

Kaufman R.H. (1980): The origin and diagnosis of „unspecific" vaginitis. N.Engl.J.Med., 303:637.

Segey B. (1980): Leucorrhées vaginales et hygiène femenine. Gazette Med.France, 87:1249.

Yourassowsky E. (1979): Les difficultés d'un diagnostic étiologique rigoureux dans l'infection genitale à Chlamydia et à Mycoplasma. Gazette Med.France, 86:4611.

Scanned with OKEN Scanner

28. EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL MATERIILOR FECALE IN DIAGNOSTICUL INFECTIILOR GASTROINTESTINALE

DUMITRU T. BUIUC

28.1. Aspecte generale

Infecţiile gastrointestinale se diferenţiază, în funcţie de
- mecanismul patogenetic
- localizare
- leziunile funcţionale şi morfologice
- expresia clinică,

în 3 mari tipuri

(i) Tipul neinflamator. Microorganismele infectante produc modificări funcţionale ale enterocitului, predominante la nivelul jejunului şi fără expresie morfologică. Expresia clinică este sindromul diareic holeriform: scaune apoase, fără leucocite, fără dureri abdominale, fără febră. Microorganismele implicate sînt

- bacterii enterotoxigene: patogene (Vibrio cholerae, unele tulpini de Salmonella) sau condiţionat patogene (tulpini enterotoxigene de Escherichia coli, Klebsiella, Citrobacter, Aeromonas ş.a., Clostridium perfringens, Bacillus cereus);
- protozoare: Giardia lamblia;
- virusuri: rotavirusuri, parvovirusuri.

(ii) Tipul inflamator. Microorganismele infectante distrug epiteliul intestinal printr-un proces invaziv şi citotoxic. Mucoasa colonului şi a ileonului terminal se prezintă congestivă, cu infiltrat inflamator celular şi ulceraţii acoperite de exsudat fibrino-purulent-sanguinolent. Expresia clinică este sindromul diareic dizenteriform: scaune fibrino-purulente-sanguinolente, cu polimorfonucleare, cu dureri abdominale şi febră. Microorganismele implicate sînt

- bacterii: patogene (Shigella, Salmonella) sau condiţionat patogene (tulpini invazive de E.coli, Vibrio parahaemolyticus, Campylobacter foetus, Staphylococcus aureus, Clostridium difficile ş.a.);
- protozoare: Entamoeba histolytica, Balantidium coli;
- posibil micete: Candida.

(iii) Tipul penetrant. Microorganismele infectante penetrează prin epiteliul intestinal, care rămîne intact, în formaţiunile limfoide ale ileonului şi în ganglionii mezenterici unde se multiplică şi de unde pot determina descărcări bacteriemice. Expresia clinică este o boală febrilă sistemică, febra enterică, însoţită de diaree. Scaunul diareic prezintă o reacţie inflamatorie cu leucocite mononucleare. Microorganismele implicate sînt bacterii: Salmonella typhi, S.paratyphi A, S.schottmuelleri, S.hirschfeldii, S.cholerae suis, Yersinia enterocolitica ş.a.

Sub raportul condiţiilor de apariţie, în grupul mare al infecţiilor gastrointestinale se particularizează

- toxiinfecţiile alimentare,
- infecţiile induse prin disbioza microbiotei indigene a colonului (enterocolite după antibioterapie orală).

In concluzie, infecţiile gastrointestinale au

- etiologie foarte variată,
- mecanisme patogenetice variate,
- diareea ca semn comun.

De aceea, examenul (cit.)-microbiologic al materiilor fecale este singura modalitate practică de diagnostic etiologic în sindroamele diareice holeriforme sau dizenteriforme şi unul din examenele importante în diagnosticul febrelor enterice (→3o.) şi al toxiinfecţiilor alimentare (→29.)

Materiile fecale şi condiţia lor microbiologică. Normal, materiile fecale conţin cca 10^{11} bacterii viabile/g. Bacteriile anaerobe (anaerobi nesporulaţi, clostridii) predomină asupra celor aerobe în raport de 1ooo:1. Dintre bacteriile aerobe predomină E.coli cu 10^8/g. Klebsiella, Enterobacter, Proteus, enterococii, stafilococii apar în cantităţi de 10^5-10^7/g. Raporturile cantitative între aceste numeroase specii sînt influenţate de dietă ca şi de desfăşurarea normală sau anormală a proceselor de digestie.

28.2. Recoltarea şi transportul probelor de materii fecale

Probele se recoltează din scaun ca atare sau direct din rect cu sonda Nelaton ori cu tamponul.

(i) Recoltarea probelor din scaunul proaspăt emis este metoda

de preferat. Bolnavul defecă într-un vas (bazinet, oală de noapte) curat, fără urme de antiseptic, decontaminat prin fierbere. La nou născut şi sugar probele se recoltează din scaunul de pe pelinca în prealabil sterilizată. Imediat se urmăresc şi se prelevă, dacă există, fragmente fibrino (muco)-purulente sau fibrino-sanguinolente, granule riziforme. Recoltarea se face cu spatula sterilă. Proba, în cantitate de cca 1 g, se suspensionează în 3-4 ml mediu de transport într-un flacon steril cu gura largă, prevăzut cu dop etanş. (fig.28-1).

(ii) Recoltarea din rect cu tamponul sau cu sonda Nelaton poate fi folosită pentru recoltări de la bolnavi în izbucniri epidemice de enterocolită. Sonda Nelaton se introduce în rect pe o distanţă de cca 15 cm la adult şi corespunzător mai puţin la copil. După recoltarea probei, sonda se descarcă prin agitare într-un flaconaş cu ser fiziologic sau mediu de transport.

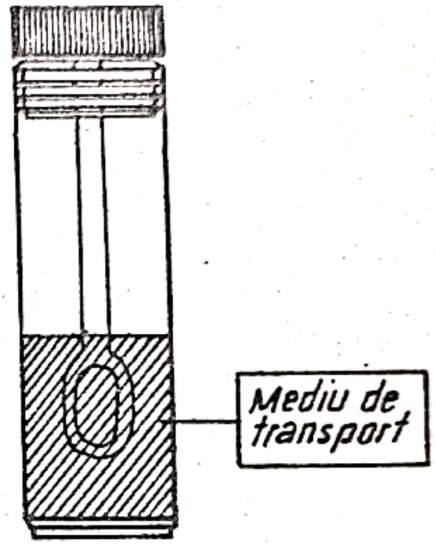


Fig.28-1 Model de recoltor pentru materii fecale

Pentru examinări la convalescenţi sau pentru depistarea purtătorilor de enterobacterii patogene este contraindicată recoltarea pe tampon rectal.*) In aceste cazuri recoltarea se face după purgare (numai pentru depistarea purtătorilor) din ultimile fracţiuni ale scaunului.

Sansele de izolare a unor patogeni cum sînt Salmonella şi Shigella sau a tulpinilor enteropatogene de E.coli cresc dacă se examinează probe multiple recoltate de la acelaşi pacient în cursul stadiului acut al bolii diareice (primele 3 zile) cînd aceste organisme se află prezente în număr mare în intestin.

Probele trebuie examinate cît mai curînd posibil după recoltare. Shigellele sînt deosebit de sensibile la antagonismul exercitat de contaminanţi i n v i t r o. Rata de supravieţuire a

*) La convalescent sau purtător bacteriile patogene se află în număr redus în materiile fecale. Dacă pe tampon se recoltează cca 100 mg materii fecale şi patogenul este în cantitate mai mică de 10.000/g, se înţelege că şansa de izolare din asemenea probă este redusă.

salmonellelor este mai mare, mai ales dacă se recurge la medii de transport şi refrigerarea probelor.

28.3. Examenul bacteriologic al materiilor fecale

28.3.1. Examenul macroscopic obiectivează suferinţa pacientului şi orientează cu probabilitate diagnosticul în funcţie de caracterele scaunului: scaunul apos cu flocoane riziforme al diareilor neinflamatorii, scaunul fibrino (muco)-purulent sau sanguinolent al enteritelor inflamatorii.

28.3.2. Examenul direct microscopic

Se pregăteşte un preparat umed între lamă şi lamelă suspensionînd un flocon de mucus din proba de scaun într-o picătură de albastru de metilen Loeffler. Se examinează cu obiectiv 40x. Absenţa sau prezenţa leucocitelor orientează rapid diagnosticul către o diaree neinflamatorie sau către o enterită inflamatorie (cel mai frecvent dizenterie bacilară). Examenul microscopic pe probe din scaun proaspăt emis dă rezultate net superioare celui pe probe recoltate cu tamponul.

Examenul între lamă şi lamelă a unei probe de scaun proaspăt recoltate permite şi urmărirea protozoarelor enteropatogene ca şi a ouălor de helminţi implicaţi uneori în boala diareică (Schistosoma).

Frotiul Gram din scaun este util la pacienţii cu enterocolită postantibiotică la care poate depista prezenţa anormal predominantă a unor microorganisme (levuri ş.a.)

28.3.3. Coprocultura

In toate enteritele inflamatorii se urmăresc sistematic prezenţa bacteriilor patogene (Shigella, Salmonella, Yersinia ş.a.) şi a bacteriilor condiţionat patogene cu capacităţi enteropatogene. In diareile neinflamatorii se urmăreşte prezenţa salmonelelor, a bacteriilor condiţionat patogene cu capacităţi enterotoxigene, iar în conjunctură epidemică şi prezenţa vibrionului holeric.

28.3.3.1. Izolarea patogenilor se face pe medii selective adecvate pentru fiecare din aceste bacterii.

(i) Salmonella, Shigella, Yersinia

Prima zi. Se însămînţează în paralel o placă cu mediu selectiv şi un tub cu mediu de îmbogăţire. Se incubează peste noapte la

37°C.

Mediile slab selective prin săruri biliare şi diferenţiale prin lactoză, mediul Mac Conkey, Leiffson ş.a., inhibă majoritatea bacteriilor gram-pozitive şi permit izolarea bacililor gram-negativi intestinali pe care îi diferenţiază în lactozo-pozitivi şi lactozo-negativi. Sînt convenabile pentru izolarea shigellelor, organisme care pe medii mai selective pot fi inhibate.

Medii moderat selective şi lactozate, mediul SS (Salmonella-Shigella), mediul cu dezoxicholat-citrat ş.a., sînt convenabile pentru izolarea salmonellelor. Prin conţinutul lor în săruri biliare şi verde brillant sînt mai puţin convenabile pentru unele tulpini de Shigella.

Mediile înalt selective, cum este mediul Wilson-Blaire cu sulfat de bismut, sînt indicate pentru izolarea bacilului tific.

Mediile de îmbogăţire, cum sînt bulionul cu selenit sau bulionul cu tetrationat, inhibă dezvoltarea bacteriilor gram-pozitive şi limitează pentru o perioadă scurtă (12-18 ore) multiplicarea coliformilor şi a speciilor de Proteus favorizînd multiplicarea salmonellelor şi, în măsură mai mică, a shigellelor.

A doua zi

- Se repică din mediul de îmbogăţire pe mediul selectiv cu incubare peste noapte la 37°C. Placa cu subcultura de pe mediul de îmbogăţire va fi urmărită pentru colonii lactozo-negative a treia şi a patra zi în eventualitatea că pe placa cu primocultura nu s-a izolat Salmonella sau Shigella.

- Colonii lactozo-negative de pe placa cu mediu selectiv însămînţată în ziua precedentă sînt repicate pentru triajul biochimic (mediu Hajna, mediu pentru uree şi mobilitate) şi pentru verificarea purităţii culturii (mediu Drigalski) (→12.2.3.).

A treia zi se face identificarea antigenică şi biochimică completă a tulpinilor pentru care testele de triaj sugerează o Salmonella sau o Shigella (→12.2.3., 12.2.4.)

(ii) Vibrio cholerae. Izolarea şi identificarea vibrionului holeric are un caracter de urgenţă. Flocoane riziforme din scaunul diareic sînt însămînţate în paralel pe o placă cu mediu selectiv (agar cu săruri biliare) şi într-un tub cu mediu de îmbogăţire (apă peptonată alcalină, pH 9,o). Coloniile suspecte apărute după 1o-12 ore pe suprafaţa mediului selectiv sînt identificate antigenic în reacţia de aglutinare pe lamă cu ser antiholeric O diluat

1:loo. In caz de aglutinare pozitivă, un diagnostic preliminar de holeră (suficient în conjunctură epidemică) poate fi stabilit pînă în 24 ore. Coloniile care au dat reacţii de aglutinare pozitive sînt repicate şi urmează confirmarea identităţii prin reacţii de aglutinare în tub cu ser antiholeric diluat 1:looo şi identificarea serotipului prin aglutinări cu seruri anti-Inaba şi anti-Ogawa. Identificarea biochimică o confirmă pe cea antigenică. In final este identificat biotipul (⟶12.3). Dacă primocultura pe mediu selectiv a rămas negativă, se urmăresc repicările făcute din mediu de îmbogăţire pe suprafaţa mediului selectiv la fiecare 4-6 ore. Izolarea şi identificarea vibrionilor holerici poate să necesite un interval mai lung la pacienţi cu forme atipice şi la purtători (pasaje repetate pe mediu de îmbogăţire pentru reuşita tentativei de izolare).

28.3.3.2. Izolarea condiţionat patogenilor. Recomandăm însămînţarea probei pe medii diferenţiale neselective, singurele care permit evidenţierea fidelă a raporturilor cantitative între bacteriile probei examinate.

Identificarea tulpinilor enteropatogene infantile de E.coli are valoare în episoade epidemice de gastroenterite infantile (copii sub 2 ani). Nu are valoare în cazuri sporadice.

Prima zi. Proba se epuizează pe un mediu diferenţial lactozat, EMB sau Drigalski. Se incubează peste noapte la 37°C.

A doua zi. Se aglutinează pe lamă cu ser polivalent cca lo colonii lactozo-pozitive. Colonia care a aglutinat cu serul polivalent se repică.

A treia zi. Se continuă identificarea prin aglutinarea cu seruri monovalente a subculturii pure (⟶12.2.4.1.)

Depistarea tulpinilor enteropatogene infantile de E.coli prin colorare cu anticorpi fluorescenţi a frotiurilor din materii fecale este o metodă mai rapidă şi mai sensibilă decît izolarea.

Incriminarea E.coli în etiologia cazurilor sporadice de gastroenterită infantilă, în enteritele copilului mare şi adultului impune dovada formală a patogenităţii prin testarea mai multor colonii pentru enterotoxigenează (inoculare pe culturi de celule ovariene de hamster de China, celule adrenale Y_1, inocularea intragastrică la şoricel sugar ş.a.) în diareile neinflamatorii sau pentru invazivitate (inoculare în sacul conjunctival la cobai =

testul keratoconjunctivitei sau testul Sereny). Sînt determinări laborioase inaccesibile laboratorului clinic. La fel şi pentru incriminarea etiologică a tulpinilor de Klebsiella, Citrobacter ş.a. trebuie adusă dovada formală a enterotoxigenităţii lor. Predominanţa acestora în scaunul diareic este numai un element de prezumţie.

Examenul materiilor fecale la pacienţii cu enterocolită postantibiotice

Examenul direct microscopic al frotiului Gram poate depista o abundenţă anormală de elemente miceliene şi levuriforme, cînd este în cauză Candida albicans; o predominanţă netă a cocilor gram-pozitivi în grămezi atunci cînd este în cauză stafilococul auriu.

Cultura confirmă în toate aceste cazuri datele examenului microscopic.

Clostridium difficile, o cauză frecventă a enteritelor postantibiotice, poate fi incriminat pe baza identificării citotoxinei sale prin inocularea filtratului de scaun în culturi de celule. Metoda nu este accesibilă laboratorului de rutină.

28.4. Examenul virologic se impune cînd investigaţiile bacteriologică şi parazitologică nu au elucidat cauza unei diarei acute. Detectarea rotavirusurilor şi ai agenţilor similari parvovirusurilor recent implicaţi în etiologia unor diarei neinflamatorii ale copiilor presupune în principal utilizarea imun-electronomicroscopiei, care depăşeşte competenţa laboratoarelor de rutină.

BIBLIOGRAFIE

Carpenter C.C.J.Jr., Mahmoud A.A.F., Warren K.S. (1977): Algorithms in the diagnosis and management of exotic diseases. XXVI Cholera. J.Infect.Dis., 136:461.

Buiuc D. (1978): Diagnosticul etiologic al diareei prin E.coli. Rev.Med.Chir.(Iaşi), 82:67.

Kaplan J.P., Fineberg H.V., Benfari Ferrara M.J., Rosenberg M.L. (1980): Value of stool cultures. Lancet, 2:413.

Korzeniowski O.M., Barada F.A., Rouse J.D., Guerrant R.L. (1979): Value of examination for fecal leukocytes in the early diagnosis of shigellosis. Am.J.Trop.Med.Hyg., 28:1031.

Păun L., Toma E. (1980): Diarei acute infecţioase, Editura medicală, Bucureşti.

29. EXAMENELE BACTERIOLOGICE IN DIAGNOSTICUL TOXIINFECTIILOR ALIMENTARE

DUMITRU T. BUIUC

Toxiinfecţiile alimentare sînt boli acute cu perioada de incubaţie scurtă (1-24 ore), care apar, cel mai frecvent epidemic, exploziv, după ingerarea unui aliment în care anumite bacterii s-au multiplicat şi au elaborat toxine. Comun, toxiinfecţiile alimentare se manifestă ca gastro-enterocolite acute cu debut brusc şi stare toxemică.

29.1. Agenţii etiologici: Salmonella (variate serotipuri), Staphylococcus aureus, Shigella, Escherichia coli (tulpini enterotoxigene), Clostridium botulinum, C.perfringens, Bacillus cereus, Yersinia enterocolitica, Vibrio cholerae, V.parahaemolyticus. In R.S.R. 6o-7o% din toxiinfecţiile alimentare sînt salmonelozice (S.typhimurium, S.enteritidis, S.cholerae suis ş.a.) iar 2o-3o% stafilococice.

29.2. Examenul bacteriologic

29.2.1. Pentru diagnosticul la bolnavi. Se examinează probe de fecale, vomă, sînge şi alimente pentru depistarea bacteriei infectante sau/şi a toxinei elaborate de aceasta (tabelul 29-1).

Criterii pentru alegerea probelor de alimente. Se trimit spre examinare probe din acele alimente care pot constitui substrat nutritiv pentru dezvoltarea bacteriilor implicate în toxiinfecţiile alimentare (carne şi produse de carne, peşte şi produse de peşte, „fructe de mare", ouă, lapte şi produse de cofetărie pe bază de ouă şi lapte, conserve de fasole verde ş.a.) şi consumate de o proporţie semnificativă statistic a celor îmbolnăviţi dar nesemnificativă a celor fără semne de boală (— testul χ^2 în cursul de Biostatistică).

Microbiologul orientează investigarea probelor în funcţie de

- prezenţa sau absenţa reacţiei inflamatorii în scaun (tabelul 29-1);
- datele clinice şi epidemiologice asupra cărora trebuie să fie avizat sistematic.

Tabelul 29-1

Probe de produse patologice, examene indicate pentru diagnosticul toxiinfecţiilor alimentare şi interpretarea lor

Bactoria	Produsul examinat[1] Fecale	Vomă	Sînge	Aliment	Criterii de implicare etiologică
Leucocite în scaun: absente					
S.aureus	C	C		Cq,T[2]	In aliment prezentă toxina ori >10^5UFC S.aureus/g sau izolarea aceluiaşi lizotip şi din fecalele şi voma bolnavilor
Salmonella	C			C	Izolarea aceluiaşi serotip din fecalele pacienţilor şi aliment
C.perfringens	C,T[3]			Cq	>10^5UFC C.perfringens/g aliment sau prezenţa enterotoxinei în filtratul de fecale sau izolarea aceluiaşi serotip din fecalele pacienţilor şi aliment
C.botulinum	C,T[4]	C,T[4]	T[4]	C,T[4]	Prezenţa toxinei ori izolarea bacteriei de la bolnavi şi/sau aliment
B.cereus	C	C		Cq	>10^5UFC B.cereus/g aliment sau izolarea sa de la bolnavi şi din aliment
E.coli	C,T[5]			Cq,T[5]	>10^5UFC E.coli/g aliment. Izolarea unei tulpini enterotoxigene sau acelaşi serotip în fecale şi aliment
V.cholerae	C			C	Izolarea din fecale şi aliment
Leucocite în scaun: prezente					
Salmonella	C		C	C	Izolarea aceluiaşi serotip de la bolnavi şi din aliment
Shigella	C			C	Ibidem
E.coli	C			C	Ibidem + demonstrarea invazivităţii[6]

1) Abrevieri: C= cultivare, Cq= cuantificarea numărului de unităţi formatoare de colonii (UFC), T= testare pentru depistarea şi identificarea toxinei.

2) Testarea enterotoxinei stafilococice prin imundublă difuzie ş.a.

3) Testarea enterotoxinei perfringens prin inoculare în ansa ligaturată a ileonului de iepure.

4) Evidenţierea şi identificarea toxinei botulinice prin testul de

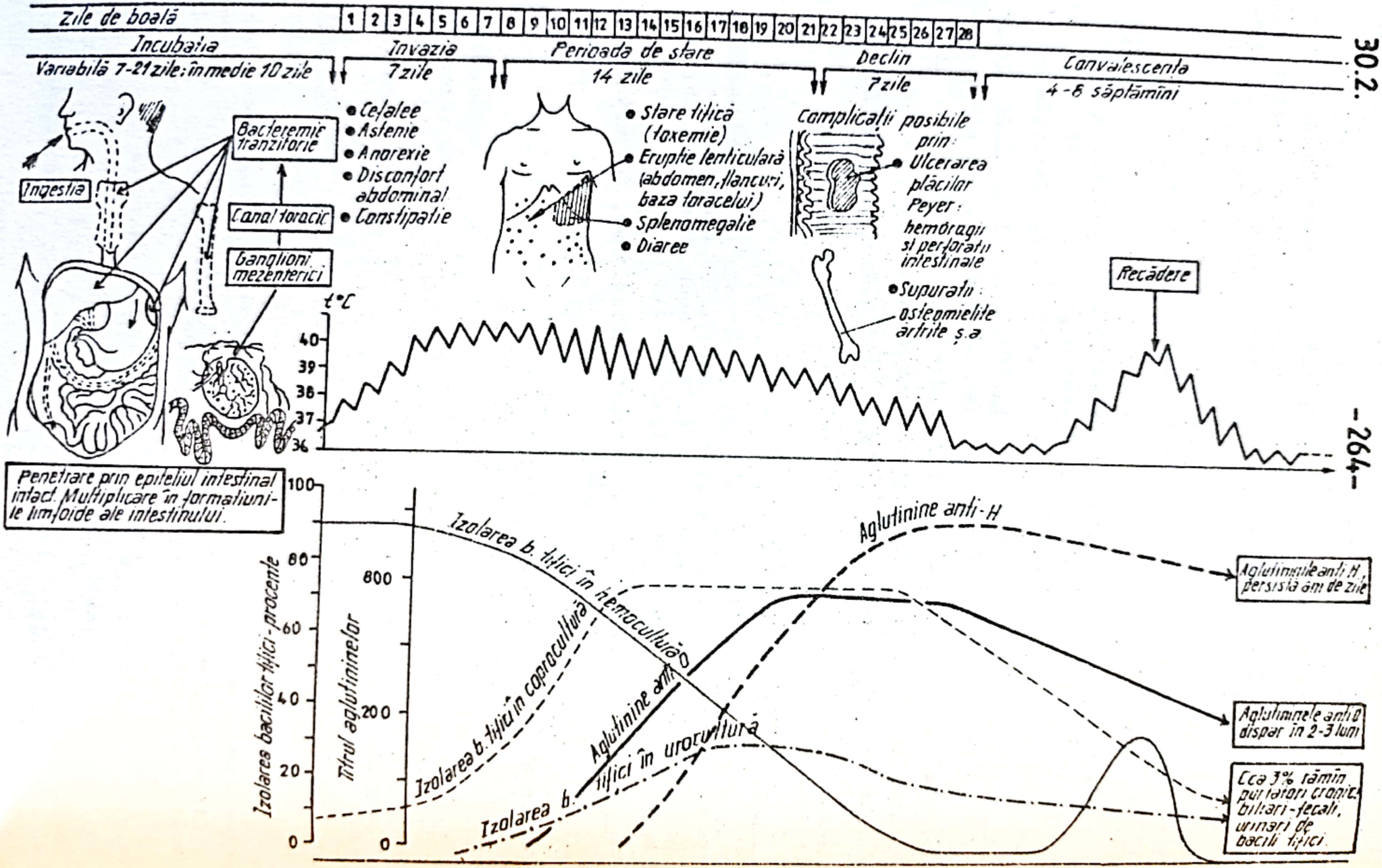
seroprotecţie a şoarecilor cu antitoxină botulinică tip A, B şi E.
5) Depistarea enterotoxinei termolabile prin inocularea filtratului în culturi de celule ovariene de hamster de China sau celule adrenale Y_1 de şoarece; enterotoxina termostabilă prin inoculare intragastrică la şoricel nou născut.
6) Prin inoculare intraconjunctivală la cobai (testul Sereny).

29.2.2. Pentru ancheta şi supravegherea epidemiologică, în afara probelor de la bolnavi se mai examinează probe de la personalul de bucătărie/laborator alimentar (fecale pentru toxiinfecţiile cu Salmonella, Shigella, V.cholerae, V.parahaemolyticus, Y.enterocolitica; tampon nasal şi puroi din leziuni inflamatorii ale mîinilor pentru toxiinfecţiile stafilococice) şi probe de mediu din bucătării/laboratoare alimentare (suprafaţa meselor, veselă etc.) (pentru toxiinfecţiile cu Salmonella, V.cholerae, V.parahaemolyticus, Y.enterocolitica).

BIBLIOGRAFIE

Hughes J.M. (1979): Food poisoning. In Mandell G.L., Douglas R.G. Jr., Bennett J.E. (editori): Principles and practice of infectious diseases. John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, pp.907-923.

Păun L., Toma E. (1980): Diarei acute infecţioase, Editura Medicală, Bucureşti, pp.87-100.



Scanned with OKEN Scanner

30. EXAMENELE BACTERIOLOGICE SI SEROLOGIC IN DIAGNOSTICUL FEBRELOR ENTERICE

DUMITRU T. BUIUC

30.1. Agenţii etiologici: Salmonella typhi (principala cauză a febrelor enterice în R.S.R.), S.paratyphi A, S.schottmuelleri (S.paratyphi B), S.hirschfeldi (S.paratyphi C), foarte rar alte salmonelle.

30.2. Patogenia febrelor enterice. A se examina şi comenta schema 30-1.

30.3. Examenul bacteriologic

30.3.1. La bolnav

Hemocultura (→21.). Indicată pe tot parcursul bolii. Prezenţa bacililor tifici în sînge este intermitentă, de aceea se vor practica 3 hemoculturi la intervale de 6-12 ore. Sansele de izolare a bacililor tifici în hemocultură sînt: 80-90% în prima săptămînă, 75% în a 2-a, 40% în a 3-a şi <10% în a 4-a săptămînă de boală. De reţinut ! după 3 ore de la administrarea cloramfenicolului şansele izolării bacililor tifici în hemocultură se anulează.

Medulocultura (măduva osoasă obţinută prin puncţie sternală). Indicată la pacienţi supuşi antibioterapiei oarbe. De reţinut, medulocultura mai este încă pozitivă după 1-2 zile de terapie cu cloramfenicol.

Coprocultura (→28.3.3.) Indicată pe tot parcursul bolii. Sansele de izolare a bacililor tifici în coprocultură cresc de la 10-15% în prima săptămînă la cca 75% în săptămînile 2-4 de boală. Coproculturi repetate (2-3) la intervale de 24 ore ameliorează şansele de izolare.

Urocultura (→24.) Indicată în săptămînile 2-4 de boală. Eliminarea bacililor tifici prin urină fiind intermitentă, se vor examina probe a cel puţin 2o ml urină timp de 3-4 zile consecutiv.

Puroiul (→23.) se examinează în cazurile, rare astăzi, de

complicaţii supurative ale febrelor enterice.

30.3.2. La convalescenţi şi purtători se practică 3 coproculturi şi uroculturi consecutive, bilicultur.

30.4. Examenul serologic

O probă de ser se recoltează la internarea oricărui pacient suspect de febră enterică. Dacă examenul bacteriologic a rămas negativ, o a 2-a probă se recoltează după 10-14 zile.

Testarea preliminară. Cele 2 probe de ser se testează în diluţiile de 1:20 şi 1:200 faţă de antigenele O şi H ale celor 4 salmonelle implicate în etiologia febrelor enterice. Cele 2 diluţii de ser sînt astfel alese pentru a elimina fenomenul de prozonă în eventualitatea unor titruri mari ale anticorpilor aglutinanţi (→5.1. şi fig.5-2).

Testarea finală. Cele 2 probe de ser se testează în diluţii pînă la 1:1600 numai faţă de antigenele aglutinate în reacţia preliminară.

Aglutininele anti-O apar între zilele 6-12 de boală, ating maximul (în jur de 1:640) în săptămîna a 4-a de boală şi dispar în decurs de 2-3 luni de la vindecare. Titrul lor nu creşte în cursul infecţiilor intercurente.

Aglutininele anti-H apar între zilele 8-15 de boală, ating maximul ($\geqslant$1:1600) în săptămîna a 4-a de boală şi persistă ani de zile după vindecare. Titrul lor creşte adesea în cursul unor infecţii intercurente.

Interpretarea rezultatelor examenului serologic este uşoară la pacienţii nevaccinaţi antitifoidic, la copii şi în general în zonele cu endemie redusă a bolii. In aceste condiţii, titruri ale aglutininelor anti-O şi -H de 1:160 sînt sugestive pentru diagnosticul de febră enterică, iar cele de 1:400 sînt aproape de certitudine. Certitudinea este asigurată numai prin surprinderea unei creşteri a titrurilor aglutinante de cel puţin 4x în cursul bolii.

La vaccinaţi aglutininele anti-H sînt lipsite de valoare diagnostică iar titrurile aglutininelor anti-O trebuie interpretate cu prudenţă şi numai pe baza dinamicii.

La puţini pacienţi cu febre enterice aglutininele O nu apar. In această situaţie se vor cerceta aglutininele anti-Vi

31. EXAMENELE BACTERIOLOGIC SI IMUNOLOGIC ÎN DIAGNOSTICUL TUBERCULOZEI

VIORICA I. PETREANU şi DUMITRU T. BUIUC

31.1. Agenţii etiologici: Mycobacterium tuberculosis, rar M.bovis şi, în anumite zone, M.africanum. Infecţii asemănătoare tuberculozei pot determina unele mycobacterii atipice.

31.2. Patogenia tuberculozei

Primoinfecţia tuberculoasă se caracterizează morfopatologic printr-un complex lezional cunoscut sub numele de „complex primar" şi format dintr-un focar inflamator granulomatos specific, şancru de inoculare, limfangită şi adenită satelită. In raport cu frecvenţa contaminării aerogene, în peste 9o% din cazuri şancrul de inoculare este subpleural iar adenita satelită este hilară. In majoritatea cazurilor aceste leziuni sînt minime, evoluează inaparent şi se vindecă microbiologic cu cicatrici minime. Consecinţele primoinfecţiei sînt instalarea imunităţii antituberculoase şi a sensibilizării la tuberculină (întreţinute prin recontaminări minime ulterioare).

La pacienţi cu reactivitate antiinfecţioasă insuficientă (primoinfecţia copilului sub 6 ani şi a pubertarului) sau în cazul unor doze infectante masive, infecţia tuberculoasă primară evoluează cu leziuni mai importante caracterizate prin procese de cazeificare la nivelul şancrului de inoculare şi a adenitei satelite. Infecţia capătă expresie clinică şi evoluează

- fie ca tuberculoză primară manifestă necomplicată cînd leziunile cazeoase evoluează spontan regresiv prin incapsulare, cicatrizare şi calcifiere; frecvent însă în asemenea focare cicatriceale infecţia tuberculoasă persistă latent;
- fie ca primoinfecţie cu complicaţii. Complicaţiile sînt:

● apariţia cavernei tuberculoase, leziune fără tendinţă la vindecare spontană, cînd masa de cazeum se ramoleşte şi este evacuată prin fistulizarea leziunilor în sisteme canaliculare (bronşii, esofag ş.a.) sau în cavităţi vecine (pleură, pericard);

● diseminarea limfatică retrogradă a infecţiei la pleură;

● diseminarea bronhogenă a infecţiei, cînd cazeum bacilifer este eliminat în bronşii;

● diseminarea hematogenă, cînd leziunile primare, pulmonară sau ganglionare, se fistulizează într-o venă sau arteră. Diseminarea hematogenă, în raport cu importanţa bacilemiei, poate interesa unul sau mai multe organe (meninge, rinichi, oase şi articulaţii etc.) sau poate fi generalizată (granulia tuberculoasă).

Imunitatea antituberculoasă, mediată celular şi însoţită de o sensibilizare de tip întîrziat la tuberculină, este relativă. Recontaminări masive sau reactivarea unor focare latente, din perioada primară a infecţiei, pot duce la apariţia tuberculozei secundare caracterizată prin leziuni proliferative, fără tendinţă la diseminare limfo-hematogenă, cu evoluţie cronică, fără tendinţă la vindecare spontană.

31.3. Examenul bacteriologic permite diagnosticul tuberculozei cînd leziunile s-au deschis la exterior (tuberculoză pulmonară, renală, abcese şi adenite fistulizate ş.a.) sau într-o cavitate abordabilă prin puncţionare (tuberculoza seroaselor, adenite nefistulizate).

Examenul bacteriologic stabileşte cu certitudine diagnosticul de tuberculoză şi are deosebită importanţă epidemiologică pentru depistarea surselor de infecţie.

31.3.1. Recoltarea probelor se efectuează în raport cu localizarea procesului tuberculos şi înainte de administrarea oricărui tuberculostatic. La pacienţii sub chimioterapie, pentru controlul debacilizării, recoltarea probelor se face după întreruperea timp de 3-7 zile a tratamentului. Un diagnostic bacteriologic pentru tuberculoză necesită recoltarea de probe repetate, timp de 2-3 zile succesiv. Se examinează probe proaspăt recoltate. Toate probele care nu pot fi examinate imediat sînt refrigerate.

In tuberculoza pulmonară se examinează spută iar la pacienţii care nu expectorează spălătura gastrică, tampon laringian sau spălătura laringo-traheală (⟶ 26.2.3.)

In tuberculoza renală se examinează probe de urină din jet mijlociu (⟶ 24.2.1.)

In tuberculoza meningeală se examinează l.c.r. In tuberculoza seroaselor exsudatul de la aceste nivele (pleural, articular ş.a.) Probele de puroi din supuraţiile în care frotiul Gram şi

însămînţările pentru bacterii piogene au rămas negative trebuie investigate pentru prezenţa bacililor tuberculozei.

Detectarea bacililor tuberculozei în diferitele probe este ameliorată dacă se procedează la o concentrare a acestora prin centrifugare 3o minute la 3ooo r.p.m. (urină, l.c.r. ş.a.), flotare (spută), ultrafiltrare (l.c.r.), în funcţie de natura probei. In vederea concentrării, produsele vîscoase (sputa) sînt în prealabil omogenizate. In general, metodele de omogenizare realizează şi decontaminarea produselor contaminate: de exemplu, tratarea cu alcali ş.a.

Tehnica: soluţie de NaOH 4% se adaugă în volum egal sau dublu la produsul de cercetat (în funcţie de abundenţa contaminării) Se agită amestecul 5 minute şi apoi se menţine la 37°C timp de 3o minute. După scoaterea de la termostat, produsul se neutralizează cu soluţie 15% fosfat monopotasic în prezenţa albastrului de bromtimol pînă la virarea culorii în galben-verzui.

31.3.2. Examenul microscopic. Prezenţa bacililor acido-alcoolo-rezistenţi (a.a.r.) pe frotiul colorat Ziehl-Neelsen are valoare diagnostică, cu excepţia examinării sedimentului urinar care poate fi contaminat cu specii nepatogene de bacili a.a.r. (de exemplu, M.smegmatis). Un rezultat pozitiv la examenul direct se va exprima: prezenţi bacili a.a.r. Pentru a considera un rezultat negativ este necesar a fi examinate minimum loo cîmpuri. In cazul depistării numai a 1-3 bacili a.a.r. pe întreg preparatul cercetat*), se notează numărul bacililor găsiţi, confirmarea rezultatului se va face după examinarea unei noi probe.

31.3.3. Izolarea pe medii de cultură. Produsele patologice necontaminate se însămînţează ca atare iar cele contaminate după decontaminare (vezi mai sus).

Fiecare probă se însămînţează pe cîte 3-4 eprubete cu mediu Löwenstein-Jensen în cantităţi de 1 ml/tub. Tuburile însămînţate sînt menţinute la 37°C în poziţie aproape orizontală, 1-2 zile, apoi sînt parafinate şi reincubate pînă la 2-3 luni cu examinare macroscopică săptămînală.

M.tuberculosis şi M.bovis se caracterizează printr-o creştere lentă. Timpul de cultivare, aspectul macroscopic şi microscopic

*) Pe lentila frontală a obiectivului pot rămîne ataşaţi bacili a.a.r. în condiţiile în care nu se şterge foarte bine uleiul de cedru după examinarea fiecărei probe.

al coloniilor din primocultură constituind prima etapă în diferenţierea mycobacteriilor patogene de cele atipice şi saprofite (→17.)

31.3.4. Izolarea prin inoculare la animale de laborator. Acest procedeu este folosit în cazul produselor sărace în bacili, recoltate în special din localizările extrapulmonare. Cobaiul este animalul cel mai utilizat fiind deosebit de receptiv la infecţia tuberculoasă.*) Probele necontaminate se inoculează ca atare, iar cele contaminate după decontaminare. Inocularea se face subcutan la 2 cobai, pe faţa internă a coapsei, în volum de maximum 1 ml.

In cazul unui produs bacilifer, după 2-3 săptămîni apare, la locul inoculării, şancrul de inoculare (nodul sau ulceraţie) şi hipertrofia ganglionilor inghinali sateliţi. Animalul moare după 1½-2 luni, prezentînd la autopsie leziuni tuberculoase caracteristice: granulaţii sau plaje cazeoase pe suprafaţa splinei, ficatului şi tuberculi pe plămîni. Evidenţierea bacililor a.a.r. pe frotiurile efectuate din organe şi izolarea bacilului Koch în culturi confirmă diagnosticul de tuberculoză.

Practicarea i.d.r. la tuberculină la cobai, după 5-6 săptămîni de la inoculare, permite un diagnostic mai precoce; în cazul unei reacţii pozitive (infiltraţie de minimum 5 mm, eritem şi necroză centrală).

31.3.5. Identificarea izolaţilor (→17.) Implicarea etiologică a mycobacteriei izolate: M.tuberculosis şi M.bovis sînt recunoscuţi ca agenţi etiologici ai infecţiei investigate ori de cîte ori sînt depistaţi într-o probă. Pentru mycobacteriile atipice acest criteriu este valabil numai în cazul probelor necontaminate în timp ce pentru probele contaminate definirea lor ca infectanţi se bazează pe izolarea în cantitate mare şi/sau izolarea repetată a aceleiaşi mycobacterii în absenţa bacililor tuberculozei.

31.3.6. Antibiograma (→8.1.2.3.)

31.4. Intradermoreacţia la tuberculină

Intradermoreacţia (i.d.r.) la tuberculină evidenţiază starea de sensibilizare de tip întîrziat instalată consecutiv primoinfec-

*) Fac excepţie tulpinile hidrazido- şi rifampicinorezistente care sînt nepatogene sau cu virulenţă atenuată pentru cobai.

ţiei tuberculoase şi după vaccinarea BCG.

In R.S.R. folosim tuberculina purificată „PPD-IC65" livrată în 2 doze:

- doza I cu 2 unităţi test (UT)/o,1 ml (fiole marcate cu roşu),

- doza II cu lo UT/o,1 ml (fiole marcate cu albastru).

Pe faţa anterioară a antebraţului, în 1/3 mijlocie, după antiseptizarea tegumentului, cu o seringă pentru tuberculină*), se inoculează strict intraderm o,1 ml PPD doza I. Injectarea este corectă dacă la locul inoculării se formează o bulă albă de edem cu diametrul de 5-6 mm, care persistă cca lo minute.

Citirea reacţiei: după 72 ore de la inoculare se înregistrează diametrul maxim (în mm) al zonei de congestie şi infiltraţie de la locul inoculării. Reacţie negativă = absenţa congestiei sau zonă congestivă mai mică de 9 mm diametru la locul inoculării. Reacţie pozitivă = zonă congestivă, cu eventuală infiltraţie, mai mare de lo mm diametru la locul inoculării.

Pacienţii cu reacţii negative la doza I sînt retestaţi cu doza II. Intervalul pînă la retestarea cu doza II nu trebuie să depăşească 15 zile pentru a evita reacţii violente datorate infecţiei tuberculoase survenite într-un atare interval.

Interpretarea rezultatelor

- Reacţie negativă: infecţia tuberculoasă este exclusă - cu condiţia ca pacientul să nu fie sub terapie imunosupresivă sau în stare de anergie fiziologică (sarcină) sau patologică (convalescenţa unor infecţii virale, rujeolă, gripă ş.a.)

- Reacţie pozitivă: pacientul a făcut primoinfecţia tuberculoasă. Tuberculoza (boala) este însă probabilă numai în următoarele circumstanţe:

- reacţie pozitivă foarte intensă la doza I (flictenă, ulceraţie, necroză);
- surprinderea virajului reacţiei de la negativ la pozitiv la copii nevaccinaţi BCG;
- surprinderea „saltului tuberculinic" (mărirea diametrului reacţiei cu mai mult de 8 mm între două testări).

Surprinderea virajului sau „saltului tuberculinic" impune

*) Seringă etanşă de 1 ml, divizată în loo, prevăzută cu ac de 1 cm lungime, fin, bine ascuţit şi cu bizou scurt.

testări în dinamică, la intervale de 6 luni*), care pot fi aplicate practic numai la contacţii din focar de tuberculoză.

BIBLIOGRAFIE

Barbu Z. (1977): Tuberculoza primară. Diseminările hematogene postprimare. Tuberculoza extrarespiratorie. In V.Moisescu „Tratat de ftiziologie", Ed.Dacia, Cluj-Napoca, pp.145-264.

Canetti M.G. (1971): Histopatogenie des lésions tuberculeuses. In Cours de microbiologie systematique. Institut Pasteur, Paris, 58ème leçon.

Canetti M.G. (1971): Les modeles experimentaux en tuberculose. Op.cit., 59ème leçon.

Dumitru St., Bungeţianu Gh. (1977): Depistarea precoce a tuberculozei. In V.Moisescu „Tratat de ftiziologie", Ed.Dacia, Cluj-Napoca, pp.501-528.

Ionescu C. (1977): Patologia generală a tuberculozei. Op.cit., pp.92-144.

*) Testări repetate la intervale de 1-2 luni duc la desensibilizare.

32. EXAMENELE BACTERIOLOGIC SI SEROLOGIC IN DIAGNOSTICUL SIFILISULUI SI A TREPONEMATOZELOR INRUDITE

DUMITRU T. BUIUC

32.1. Agenţii etiologici: sifilis - Treponema pallidum, pian - T.pertenue, pinta sau carate - T.carateum. Toate 3 speciile sînt necultivabile i n v i t r o , au o morfologie asemănătoare (⟶18.) şi aceeaşi structură antigenică

- un antigen lipoidic, cardiolipinul, larg răspîndit în lumea vie;
- un antigen proteic de grup, comun treponemelor patogene, necultivabile, şi celor nepatogene, cultivabile (de exemplu, tulpina Reiter a T.phagedenis);
- antigene specifice treponemelor patogene.

32.2. Patogenia sifilisului. A se examina şi comenta schema 32-1.

Spre deosebire de sifilis, boală cu transmitere sexuală şi răspîndire mondială, atît pianul cît şi pinta evoluează numai în zone tropicale şi nu sînt boli cu transmitere sexuală. Pianul evoluează ca şi sifilisul în 3 stadii, dar şancrul de inoculare este extragenital, iar leziunile din stadiul secundar (erupţie papulo-ulcerativă) şi terţiar (gome ş.a.) interesează numai tegumentele, eventual oasele, respectînd mucoasele şi viscerele. In pinta leziunile din stadiul de generalizare a infecţiei sînt numai cutanate sub forma unei erupţii cu elemente eritematoase şi hiperpigmentate străbătute de crevase cutanate în care abundă treponemele.

32.3. Examenul bacteriologic. Posibilităţile laboratorului se rezumă numai la depistarea şi identificarea treponemelor în serozitatea din şancrul de inoculare în sifilis şi pian sau din crevasele cutanate în pinta prin examen microscopic pe fond negru (⟶2.2.1., 18.) Este esenţial ca probele să se recolteze fără utilizare de antiseptic, decontaminarea leziunii făcîndu-se numai mecanic prin spălare cu soluţie salină izotonă şi abraziune cu tampon steril de tifon. După uscarea suprafeţei cu tamponul, se

comprimă baza leziunii iar serozitatea care apare se recoltează prin aplicarea unei lamele. Se montează preparatul între lamă şi lamelă şi se examinează la microscopul cu fond negru.

Erori posibile

- rezultate fals pozitive prin confuzii cu treponeme saprofite,
- rezultate fals negative prin dispariţia treponemelor din serozitate în cursul unei terapii antimicrobiene oarbe.

De aceea, în diagnosticul sifilisului se recurge la examenul bacterioscopic pe fond negru numai în primele 3-4 săptămîni de evoluţie a şancrului pînă la pozitivarea serologiei.

32.4. Examenul serologic

Particularităţi: un volum mare de seruri supuse examinării din necesitatea depistării active a infecţiei sifilitice atît în stadiile manifeste cît şi în cel de latenţă.

In tabelul 32-1 sînt prezentate rezumativ caracteristicile pe baza cărora sînt stabilite indicaţiile diferitelor teste în serodiagnosticului sifilisului.

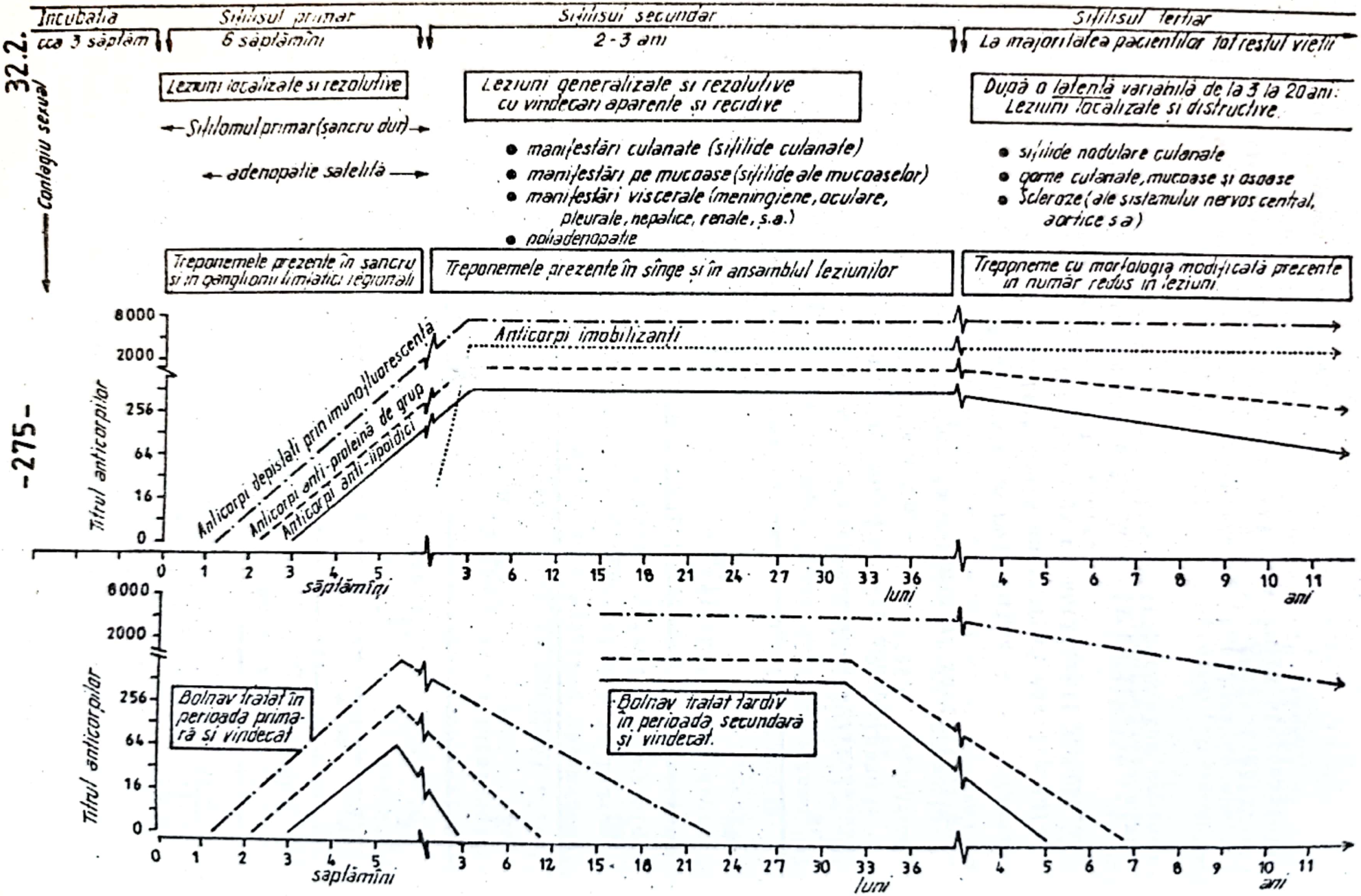
32.4.1. Testarea de rutină urmăreşte sistematic anticorpii antilipoidici pentru următoarele motive

- cardiolipinul este cel mai accesibil antigen;
- reacţiile de floculare (Kline, VDRL) şi de fixare a complementului prin care sînt urmăriţi anticorpii antilipoidici au o sensibilitate satisfăcătoare;
- anticorpii antilipoidici sînt singurii indicatori fideli ai sifilisului activ şi ai vindecării. După vindecare anticorpii antilipoidici sînt primii care dispar, cu atît mai repede cu cît tratamentul eficient s-a aplicat într-un stadiu mai precoce al bolii. Din contra, anticorpii antiproteici de grup şi, mai ales, cei specifici treponemelor patogene persistă la titruri mari mult timp după vindecare, chiar toată viaţa dacă vindecarea a fost tardivă. De aceea, criteriul eficienţei terapeutice şi al vindecării sifilisului este scăderea constantă a titrului anticorpilor antilipodici în probe de ser recoltate la intervale de 1 lună în cazul tratamentului precoce şi trimestrial în cadrul celui tardiv (⟶ schema 32-1). Negativarea testelor pentru anticorpii antilipoidici în l.c.r. este criteriul vindecării în neurosifilis.

Prezenţa anticorpilor antilipoidici la pacienţii cu simpto-

Scanned with OKEN Scanner

32.2.



Tabelul 32-1

Caracteristici care stabilesc indicaţiile diferitelor teste pentru serodiagnosticul practic al sifilisului

Caracteristici considerate	Cardiolipin Reacţii de floculare: RFC Kline,		Antigen proteic de grup RFC	T.pallidum tulpina Nichols FTA-ABS[1]	TPI[2]
Accesibilitatea pentru laboratorul clinic	Cele mai accesibile		Accesibil	Accesibil limitat[3]	Inaccesibil[4]
Sensibilitatea	++	+	+++	++++	++++
Indicator pentru sifilisul activ şi răspunsul terapeutic	Da	Da	Insuficient[5]	Nu	Nu[6]
Prezenţa în boli de colagen, lepră, malarie, infecţii febrile acute, sarcină prenatal	Da	Da	Da[7]	Nu	Nu
Precizarea situaţiei pacienţilor cu semne de sifilis şi fără anticorpi lipoidici			Da	Da	Da
Precizarea situaţiei pacienţilor fără semne de sifilis şi cu anticorpi antilipoidici			Nu[7]	Da	Da
Diferenţierea între treponematozele înrudite	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu

1) Testul de imunofluorescenţă indirectă cu ser absorbit.
2) Testul de imobilizare a treponemelor.
3) Pentru laboratoarele care dispun de antigen şi facilităţi pentru microscopia cu fluorescenţă.
4) Practicat numai în laboratoarele de referinţă.
5) După vindecare dispar mai lent decît anticorpii antilipoidici.
6) Numai la pacienţii cu neurosifilis şi cu anticorpii antilipoidici absenţi: negativarea TPI în l.c.r.
7) Posibile rezultate fals pozitive la pacienţi cu infecţii mixte orofaringiene şi genitale cu participarea treponemelor comensale.

matologie sugestivă confirmă diagnosticul de sifilis.

Prezenţa anticorpilor antilipoidici în absenţa simptomatologiei sugestive poate fi urmarea

- sifilisului latent sau

● altor condiţii patologice ori fiziologice, temporare (infecţii acute ca mononucleoza infecţioasă ş.a., gravide prenatal, procese de cicatrizare) sau permanente (boli de colagen, infecţii granulomatoase ca lepra ş.a.)

Absenţa anticorpilor antilipoidici în prezenţa unei simptomatologii sugestive nu poate exclude diagnosticul de sifilis.

Reacţia de fixare a complementului cu antigen proteic de grup poate fi practicată în paralel cu testele pentru anticorpii antilipoidici. RFC cu antigen proteic de grup este mai sensibilă decît cea cu cardiolipin şi numărul rezultatelor fals pozitive mai mic, dar nu exclus (pacienţi cu infecţii mixte bucale, genitale ş.a. cu participarea treponemelor comensale). Anticorpii antiproteici de grup pot fi absenţi la unii pacienţi cu sifilis.

32.4.2. Testarea de verificare urmăreşte anticorpii specifici treponemelor patogene prin testele de imunofluorescenţă indirectă cu seruri absorbite cu suspensii de treponeme cultivabile, de exemplu tulpina Reiter, (FTA-ABS) sau testul de imobilizare a treponemelor (TPI). Accesibilitatea la aceste teste este limitată. De aceea sînt utilizate numai după triajul de rutină al serurilor şi vizează

● precizarea situaţiei pacienţilor cu simptomatologie sugestivă pentru sifilis dar fără anticorpi antilipoidici (eventual şi fără anticorpi antiproteici de grup);

● precizarea situaţiei pacienţilor fără semne de sifilis dar cu anticorpi antilipoidici prezenţi;

● verificarea vindecării la acei pacienţi cu neurosifilis şi cu teste pentru anticorpii antilipoidici negative: dispariţia anticorpilor din l.c.r. semnează vindecarea acestor pacienţi.

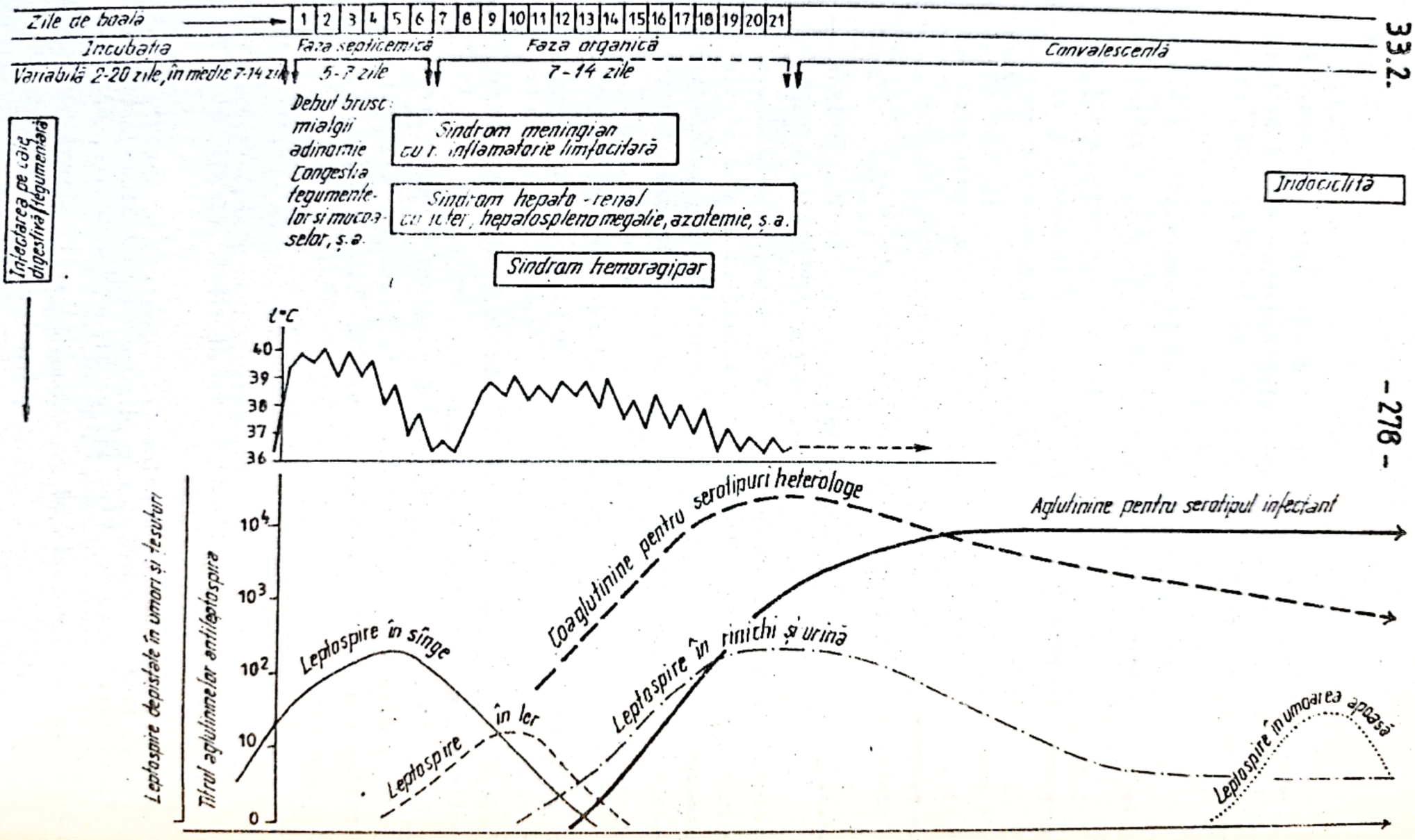
BIBLIOGRAFIE

Duca E., Bernescu E. (1976): Propuneri pentru standardizarea serodiagnosticului sifilisului. Rev.Med.Chir.(Iaşi), 80:457; 611.

Georgescu M., Ionescu D., Debeleac L., Dimitriu L. (1978): Valoarea şi limitele metodelor de diagnosticare serologică a sifilisului. Bacteriol.Virusol.Parazitol.Epidemiol., 23:113.

Luger A. (1981): Diagnosis of syphilis. Bull.Wld Hlth Org. 59:647.

Scanned with OKEN Scanner



Scanned with OKEN Scanner

33. EXAMENELE BACTERIOLOGIC SI SEROLOGIC IN DIAGNOSTICUL LEPTOSPIROZELOR

DUMITRU T. BUIUC

33.1. Agenţii etiologici. Serogrupele de Leptospira implicate în infecţii ale animalelor şi omului în R.S.R. sînt în ordinea frecvenţei L.pomona, L.hyos şi L.canicola. Mai rar sînt implicate tulpini din serogrupele L.icterohaemorrhagiae, L.bataviae, L.australis sau L.hebdomadis. In general, cele mai grave infecţii sînt date de L.icterohaemorrhagiae.

33.2. Patogenia leptospirozelor. A se examina şi comenta schema 33-1.

33.3. Examenul bacteriologic. Se urmăresc leptospirele în sînge, l.c.r., urină şi, în determinările oculare tardive, în umoarea apoasă. La pacienţii decedaţi sînt urmărite în rinichi. Pentru depistarea leptospirelor în urină este esenţial ca aceasta să fie alcalinizată prin administrare prealabilă de citrat de potasiu pacientului.

Examenul microscopic pe fond negru este indicat pentru sedimentul urinar, l.c.r. şi umoarea apoasă; în cazul plasmei sînt posibile erori prin confuzii între expansiunile fibrilare ale trombocitelor şi hematiilor cu leptospirele. Examenul secţiunilor histologice colorate prin impregnare argentică este util pentru depistarea leptospirelor în rinichi.

Izolarea. Inocularea intraperitoneală la cobai tineri (llo-12o g) în paralel cu însămînţarea probelor în mediul Korthof (soluţie salină izotonă, tamponată şi cu adaus de peptonă şi ser de iepure) oferă şanse mai mari pentru izolare decît fiecare metodă separat. Pentru izolarea leptospirelor din urină, la mediul de cultură se adaugă inhibitori bacterieni selectivi, fără influienţă asupra leptospirelor (de exemplu, 5 fluorouracil în cantitate de 2oo-4oo μg/ml). Sansele de izolare i n v i t r o a leptospirelor cresc dacă se neutralizează efectul leptospirostatic al umorilor şi ţesuturilor prin diluţii succesive ale probei. Un prim tub conţinînd lo ml mediu va fi însămînţat cu o,5 ml sînge. După omo-

genizare, o,3 ml din primul tub vor fi transvazaţi în al doilea tub conţinînd 3 ml mediu iar din acesta, asemănător, o,3 ml vor fi transvazaţi în al 3-lea tub cu 3 ml mediu.

Mediile de cultură însămînţate, incubate la 30°C şi întuneric, se urmăresc pînă la 3o zile. Pentru modul de urmărire a culturilor, animalelor inoculate şi identificarea leptospirelor izolate → 18.

Reamintim, izolarea şi identificarea leptospirelor sînt tehnici de competenţa unor laboratoare specializate.

33.4. Examenul serologic. O probă de ser se recoltează la internarea pacientului iar o a doua probă după 14-21 zile.

Reacţia de fixare a complementului este accesibilă laboratoarelor de rutină. Folosind un antigen cu specificitate de gen, poate stabili numai diagnosticul de leptospiroză fără a preciza serogrupul tulpinii infectante. Anticorpii fixatori de complement persistă la convalescenţi 2-6 luni. Este o reacţie de sensibilitate medie care nu dă rezultate în serodiagnosticul complicaţiilor leptospirozice tardive (iridociclite ş.a.)

Reacţia de aglutinare-liză are specificitate de serogrup şi tip şi este cea mai sensibilă (titruri de ordinul a 1:1o.ooo), dar este rezervată laboratoarelor specializate care întreţin colecţii de Leptospira. Din cauza reactivităţii heterologe (coaglutinine pentru serotipuri heterologe depăşind titrul aglutininelor pentru serotipul infectant, → schema 33-1), în cursul bolii şi în convalescenţa precoce este precaut să rămînem numai la diagnosticul de leptospiroză. Serogrupul (tipul) infectant urmează a fi confirmat prin testarea unei probe de ser în convalescenţa tardivă (2-3 luni după vindecare).

BIBLIOGRAFIE

Alexander A.D. (1974): Leptospira. In Lennette E.H., Spaulding E.H., Truant J.P. (editori): Manual of Clinical Microbiology, ediţia II-a, Amer.Soc. Microbiol., Washington, pp.347-354.

Farrar W.E. (1979): Leptospira species (Leptospirosis). In Mandell G.L., Douglas R.G. (editori): Principles and practice of Infectious diseases, John Wiley & Sons, New York, Chichester Brisbane, Toronto, pp.1844-1848.

O.M.S. (1967): Sér.rapp.techn. No.38o. Problèmes actuels des recherches sur la leptospirose. Génève.

Scanned with OKEN Scanner

34. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL VIROZELOR ERUPTIVE

MIRCEA GH. ALEXANDRESCU

Agenţii virali incriminaţi în etiologia manifestărilor eruptive sînt incluşi în tabelul 34-1.

In vederea elaborării unei metodologii de diagnostic de laborator este utilă clasificarea virozelor în funcţie de aspectul clinic al erupţiei (tabelul 34-2).

34.1. Recoltarea produselor patologice

In raport cu agentul viral incriminat în producerea virozei eruptive este indicat a se recolta sînge, exsudat faringian, materii fecale (în infecţiile cu virusurile ECHO, Coxsackie, enterovirus) şi îndeosebi produse din leziunile cutanate:

- In stadiul erupţiei maculare şi papulare se recoltează serozitatea obţinută prin raclare cu o lanţetă fără a se produce sîngerarea.

- In stadiul vezicular se recoltează prin puncţionare cu o pipetă Pasteur fin efilată conţinutul veziculelor. Baza veziculelor deschise va fi raclată cu o ansă sterilă şi cu produsul obţinut se confecţionează frotiuri pe lame de microscopie sau este introdus într-un tub de sticlă steril în vederea izolării virusului, executării unor reacţii serologice sau pentru un examen electronooptic.

- In faza de pustule şi cruste se prelevă conţinutul pustulelor. Crustele se detaşează fără sîngerare şi se introduc în eprubete sterile.

Pentru serodiagnostic se prelevă cel puţin 2 eşantioane de ser la un interval de 10-14 zile.

34.2. Examenul direct al produselor patologice recoltate

Examenul microscopic al frotiurilor după colorare specială (Giemsa, Nicolau) evidenţiază corpusculi elementari din familia Poxviridae. Se pot observa celule gigante multinucleate şi incluzii citoplasmatice sau nucleare (incluzii tip Cowdry) în herpes.

Examenul electronooptic pe produs patologic contrastat ne-

Tabelul 34-1

Clasificarea agenţilor virali care produc manifestări eruptive

Familia de virus	Subfamilie şi/sau gen	Specia de virus	Boli cauzate
POXVIRIDAE	Orthopoxvirus	vaccina	-vaccina -vaccina progresivă -vaccina generalizată -eczema vaccinatum -encefalita postvaccinală
		cowpox (variola vacilor)	-infecţie mulgători
		monkeypox (variola maimuţelor)	-infecţie transmisă de la maimuţă (Africa)
		variola	-infecţie eradicată
	Parapoxvirus	virus Orf (dermatita pustuloasă ovină)	-infecţie transmisă de la capre şi oi
		v.nodulii lăptarilor	-infecţie transmisă de la vaci
HERPESVIRIDAE	Alphaherpesvirinae	herpesvirus hominis 1,2	-infecţii primare sau recurente -dermatita veziculară -eczema herpetică -gingivostomatita -faringotonsilita -boli oculare -encefalită -meningoencefalită -cervicită -penită -uretrită -prostatită -hepatită -boală diseminată
		herpesvirus hominis 3 (varicella-zoster)	-varicela-zoster
	Betaherpesvirinae	betaherpesvirus hominis 5 (v.citomegalic)	-boală citomegalică congenitală sau cîştigată
	Gammaherpesvirinae	gammaherpesvirus hominis 4 (v.Epstein-Barr)	-mononucleoză infecţioasă -limfom Burkitt

Tabelul 34-1
(continuare)

Familia de virus	Subfamilie şi/sau gen	Specia de virus	Boli cauzate
TOGAVIRIDAE	Rubivirus	v.rubeolic	-rubeola
PARAMYXO-VIRIDAE	Morbilivirus	v.rujeolic	-rujeola
NECLASIFICAT	-	v.molusculum contagiosum	-leziuni localizate (tumorete) piele

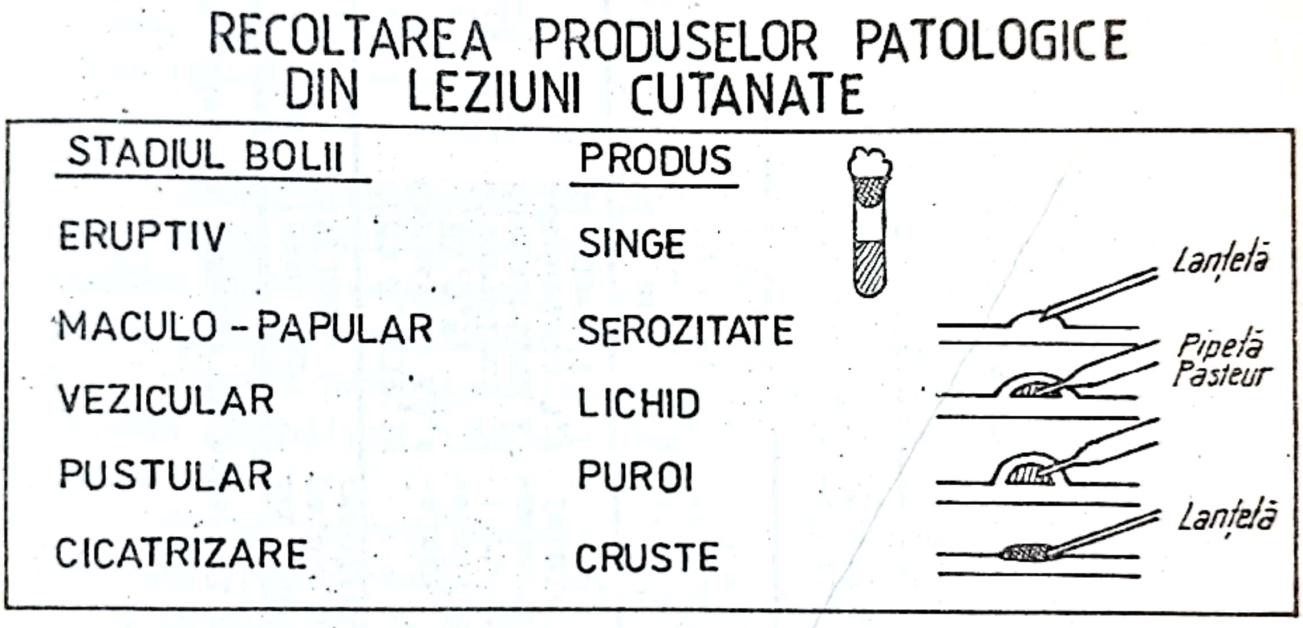


Fig.34-1 Recoltarea produselor patologice din leziunile cutanate

gativ permite stabilirea unui diagnostic rapid, de certitudine, bazat pe aspectul uneori caracteristic al virionului (virusul variolic, virusul herpetic).

Examenul imunofluorescent prin metoda directă sau indirectă depistează antigenele virale în celulele infectate.

Reacţiile imunologice specifice (reacţia de fixare a complementului, reacţia de precipitare în gel de agar, imunoelectroforeză contracurent ş.a.) pot depista antigenele virale specifice direct în produsele patologice.

34.3. Izolarea virusului din produsele patologice

34.3.1. Inocularea pe membrana chorio-alantoidă (MCA) a oului de găină embrionat permite, după o incubare de 3-4 zile, izolarea

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 34-2

Clasificarea virozelor eruptive în funcţie de aspectul clinic al erupţiei

Caracterul erupţiei	Virus frecvent întîlnit	Virus rar întîlnit	Produse patologice recoltate	Diagnostic direct	Serodiagnostic.)
Maculo-papulară	v.rujeolic v.rubeolic ECHO 4,6,9,16 Coxsackie A9, A16,23; Enterovirus 71	ECHO 2,5,11,18 Coxsackie A2,4 B1,3,5; Enterovirus 7o Herpesvirus 4 Adenovirus 3,7 Reovirus 2	-sînge, -exsudat faringian, -materii fecale	izolare virus culturi celulare (posibil)	RFC frecvent RIH RN
Veziculară	Herpesvirus hominis 1,2,3	Vaccina Coxsackie A4,5 A9,1o,16; Enterovirus 71	-lichid vezicule, -sînge	izolare virus, examen microscopic	RFC RN
Pustulară	v.vaccina		-lichid pustule	examen microscopic, izolare virus	RFC
Hemoragică	Arbovirusuri		-l.c.r. -sînge	izolare virus	RFC RIH
Leziuni localizate piele	v.molusculum contagiosum	Cowpox, nodulii lăptarilor, v.Orf	-biopsie, -sînge	exam.microscopic -	-

.) RFC = reacţia de fixare a complementului; RIH = reacţia de inhibare a hemaglutinării; RN = reacţia de neutralizare.

unor virusuri eruptive: vaccinal, herpetic, cowpox. Apar leziuni sub formă de pustule (poxuri) care după aspectul morfohistologic permit diferenţierea între:

- virusul vaccinal care induce formarea unor leziuni mai mari cu diametrul de 4-5 mm, cu centrul necrotic şi hemoragii;
- virusul cowpox (variola vacilor) care produce aceleaşi leziuni însă cu prezenţa unor hemoragii mai mari;
- virusul herpetic care induce formarea unor leziuni mici pustuloase, cu necroză centrală;
- celelalte virusuri eruptive nu cultivă pe MCA;

examenul histopatologic al secţiunilor prin MCA depistează în celulele infectate prezenţa incluziilor citoplasmatice (virusul vaccinal, cowpox) sau nucleare (virusul herpetic).

34.3.2. Inocularea culturilor de celule primare (rinichi de maimuţă, amnios uman ş.a.) culturilor de celule diploide (WI-38) sau liniilor continue de celule (HeLa, KB) permite izolarea majorităţii agenţilor virali incriminaţi în sindroamele eruptive:

- virusul herpetic determină un efect citopatogen caracterizat prin rotunjirea celulelor, balonizare şi uneori apariţia de sinciţii;
- virusul herpes hominis 3 determină efect citopatogen caracterizat prin rotunjirea celulelor şi gruparea lor;
- în liniile de celule SIRC (cornee de iepure) , RK-13 (rinichi de iepure), VERO (celule renale de maimuţă) virusul rubeolic cultivă producînd efect citopatogen vizibil la lupa binoculară.

34.3.3. Unele virusuri pot fi izolate prin inocularea animalelor de laborator:

- şoarecele alb (sugar) inoculat intracerebral (virusul herpetic, arbovirusuri);
- iepure, prin scarificare corneeană (virusul herpetic, virusul vaccinal). Boala se manifestă cu fenomene de encefalită sau keratită.

Majoritatea virozelor eruptive atunci cînd evoluează epidemic sînt uşor de diagnosticat clinic. Aceeaşi conduită este valabilă şi pentru virozele eruptive localizate.

Diagnosticul de laborator se impune în cazul infecţiei rubeolice la gravide cunoscîndu-se importanţa efectelor teratogene ale

virusului şi în consecinţă posibilitatea apariţiei unui sindrom rubeolic congenital (defect de vedere, cataractă, retinopatii, glaucom; surditate, defecte cardio-vasculare, întîrziere mintală etc.)

Diagnosticul de laborator este util în cazurile de herpes neonatal, infecţii arbovirale eruptive sau elucidarea unor noi etiologii (enterovirus 7o, 71).

34.4. Serodiagnosticul se bazează pe cercetarea dinamicii anticorpilor în 2 sau mai multe eşantioane de ser prelevate de la pacienţi la intervale de 2-3 săptămîni.

In mod curent dispunem de antigene fixatoare de complement şi, pentru unele virusuri eruptive, hemaglutinante (virusul rubeolic, rujeolic).

Reacţia de fixare a complementului prezintă avantajul, cel mai adesa, al unei specificităţi de grup, evidenţiind clase de anticorpi care persistă în organism cîteva luni (IgM) ceea ce ne permite afirmarea unei infecţii actuale sau recente. Folosirea unei „baterii de antigene" permite stabilirea unui diagnostic diferenţial.

Reacţia de inhibare a hemaglutinării este aplicată frecvent în serodiagnosticul infecţiei rubeolice la gravide. Eşantioanele de ser sînt tratate pentru înlăturarea inhibitorilor nespecifici (adsorbţie pe caolin, tratare cu heparină-$MgCl_2$, sulfat de dextran-$CaCl_2$). Antigenul rubeolic are capacitate hemaglutinantă faţă de hematiile puilor de găină de o zi, porumbel sau hematii umane tratate în prealabil cu tripsină la 4°C. Pentru afirmarea infecţiei rubeolice anticorpii de tip IgM sînt evidenţiabili în reacţia de inhibare a hemaglutinării prin utilizarea de seruri tratate cu 2-mercaptoetanol (care anulează funcţia anticorp a IgM).

35. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL ENTERO SI NEUROVIROZELOR

MIRCEA GH. ALEXANDRESCU

35.1. Principalele sindroame enterice sau cauzate de enterovirusuri sînt prezentate în tabelul 35-1.

Tabelul 35-1

Principalele sindroame enterice sau cauzate de enterovirusuri

Sindrom	Virus frecvent întîlnit	Virus rar întîlnit
Boala febrilă de vară	majoritatea enterovirusurilor	Enterovirus 71
Herpangina	virusul Coxsackie A1,6,8,lo	alte tipuri de virus Coxsackie
Mialgia epidemică	virusul Coxsackie B1-5	
Pancreatită	virusul Coxsackie B1-5	
Hepatită	virusul Coxsackie B1-5	
Gastroenterită (îndeosebi infantilă)	Rotavirus 1-4 agentul Norwalk agentul Hawai	virusuri ECHO 11,14, 18,19,22 virusuri Coxsackie A Coronavirus Adenovirus Reovirus 1-3
Carditâ	virusul Coxsackie B1-5	
Uremie hemolitică	virusul Coxsackie B	

35.1.1. Recoltarea produselor patologice

In toate sindroamele clinice se recoltează materii fecale şi, în funcţie de sindromul particular investigat, exsudat faringian, l.c.r., fragmente de sistem nervos central şi muşchi cardiac prelevate la necropsie. In vederea efectuării serodiagnosticului se prelevă şi două eşantioane de ser, primul în faza acută şi al doilea în convalescenţa bolii (interval de recoltare 2-3 săptămîni).

35.1.2. Diagnosticul virologic

35.1.2.1. Metode rapide de diagnostic. In unele sindroame (gastro-

enterită infantilă, de exemplu) este posibil un diagnostic rapid prin depistarea agentului viral direct în materiile fecale cu ajutorul tehnicilor:

- microscopie electronică sau imun-electronomicroscopie;
- reacţie de hemaglutinare şi inhibare a hemaglutinării cu seruri imune cunoscute;
- reacţiile imunoenzimatice (ELISA);
- radioimundozare;
- imunoelectroforeza contracurent;
- RFC;
- tehnica anticorpilor fluorescenţi.

35.1.2.2. Izolarea şi identificarea virusurilor infectante. In alte sindroame enterice este necesară izolarea şi identificarea agentului viral.

35.1.2.2.1. Izolarea agentului viral este posibilă de cele mai multe ori prin inocularea produselor patologice de la bonav în:

- culturi de celule renale de maimuţă (poliovirus, ECHO, Coxsackie), amnios uman, linia de celule VERO, culturi de celule diploide (Wi-38); se observă apariţia de modificări celulare (efectul citopatogen);
- culturi de organ (de exemplu, intestin de embrion uman pentru izolarea rotavirusurilor);
- şoricei nou născuţi (24-48 ore) inoculaţi subcutanat, intraperitoneal sau intracerebral pentru izolarea virusurilor Coxsackie

35.1.2.2.2. Identificarea virusului izolat se realizează cel mai frecvent cu ajutorul reacţiei de neutralizare în culturi de celule. Reacţia de fixare a complementului fiind specifică de serotip nu prezintă avantaje vizibile.

Dat fiind multitudinea serotipurilor Coxsackie A (24 serotipuri), B (6 serotipuri), poliovirus (3 serotipuri), ECHO (31 serotipuri) identificarea devine o tehnică dificilă. Pentru diagnosticul unor asemenea infecţii este suficientă izolarea agentului viral şi efectuarea reacţiei de neutralizare cu eşantioanele de ser prelevate în cursul infecţiei de la bolnav.

35.1.3. Serodiagnosticul enterovirozelor

Se bazează în principal pe evidenţierea apariţiei şi creşterii titrului anticorpilor serici (fixatori de complement sau neutralizanţi) în cele două eşantioane de ser prelevate de la pacienţi. O importanţă deosebită o prezintă identificarea în eşantioa-

nele de ser prelevate a anticorpilor specifici virusului izolat aparţinînd clasei IgM (ceea ce demonstrează un răspuns imun primar).

35.2. Principalele sindroame clinice realizate de virusurile cu tropism pentru sistemul nervos central sînt prezentate în tabelul 35.2.

Tabelul 35-2

Sindroame clinice realizate de virusurile cu tropism pentru sistemul nervos central

Sindrom	Virus frecvent întîlnit	Virus rar întîlnit
Meningita aseptică	Poliovirus 1-3 virusul urlian (parotiditei epidemice) virusul Coxsackie B1-6 virusul Coxsackie A9 virusurile ECHO 4, 6,9,11,14,18,3o	alte enterovirusuri virusul Herpes simplex virusul choriomeningitei limfocitare (CML)
Paralizie (boală paralitică)	Poliovirus 1-3	virus Coxsackie A7
Encefalită	Arbovirusuri virusul Herpes simplex Enterovirusuri	virus Coxsackie A7 virusul urlian virusul rabic Adenovirus 7 virusul herpetic simian B
Encefalomielită post infecţie	virusul rujeolic	virusul vaccinal virusul varicella-zoster virusul urlian virusul gripal
Encefalopatie		virusul rubeolic
Sindrom Reye		virusul gripal
Polinevrită		virusul varicella-zoster virusul gripal
Sindrom Guillain-Barré Paralizie Bell Mielită transversă Radiculonevrită		virusul Epstein Barr
Boli degenerative ale SNC: - opticonevrita subacută - panencefalită sclerozantă subacută (PESS)		virusul herpetic virusul rujeolic

Tabelul 35-2
(continuare)

Sindrom	Virus frecvent întîlnit	Virus rar întîlnit
- leucoencefalopatie subacută		virus Papova
Boala Creutzfeldt-Jacob		virusuri lente (viroizi ?)
Boala Kuru		

35.2.1. Recoltarea produselor patologice

In infecţiile virale ale sistemului nervos central se recoltează l.c.r., sînge, materii fecale, exsudat faringian, iar postmortem fragmente de creier, măduvă.

35.2.2. Diagnosticul virologic

35.2.2.1. Metode rapide de diagnostic

(i) Examenul microscopic direct al amprentelor de ţesut nervos (cornul lui Ammon, zona hipocamp) după colorare specială (Sellers) relevă modificări caracteristice în infecţia rabică: prezenţa de incluzii citoplasmatice oxifile în celulele nervoase (corpusculii Babeş-Negri)

(ii) Examenul imunofluorescent prin metoda directă permite de asemenea detectarea antigenelor virusului rabic în absenţa corpusculilor Babeş-Negri (pozitivitate 99%)

35.2.2.2. Izolarea şi identificarea virusurilor infectante

35.2.2.2.1. Izolarea virusului incriminat în infecţie este posibilă prin inocularea gazdelor de laborator:

- culturi de celule renale de maimuţă (Poliovirus, virusuri Coxsackie, ECHO), linie de celule VERO, culturi de celule diploide (Wi-38). Se urmăreşte apariţia modificărilor celulare degenerative (efectul citopatogen).

- Din fragmente de sistem nervos central recoltate prin punctie biopsie de la pacienţii cu sindroame neurologice degenerative sau panencefalită sclerozantă subacută se izolează virusul prin cocultivarea celulelor nervoase împreună cu celule renale de maimuţă (virusul rujeolic).

- Inocularea animalelor de laborator, în special a şoarecelui nou născut (24-48 ore), pe cale subcutană sau intracerebrală constituie un procedeu uzual de izolare a virusurilor Coxsackie A şi B:

Scanned with OKEN Scanner

. tulpinile de virus A determină paralizii de tip flasc ale membrelor cu leziuni musculare degenerative (dispariţia striaţiilor transversale, degenerescenţă hialină) şi infiltrative (infiltraţii cu mononucleare);

. tulpinile de virus B produc tremor, spasm muscular generalizat, paralizii de tip spastic. Apar leziuni în sistemul nervos central, pancreas, ţesutul adipos interscapular, hepatic, pulmonar şi miocardic .

- Inocularea intracerebrală a şoarecelui adult permite izolarea virusului choriomeningitei limfocitare: animalele inoculate prezintă, după o perioadă de incubaţie, contracturi tonico-clonice la excitaţii sonore. Moartea animalului survine adesea în criză cu o poziţie caracteristică: membrele posterioare în extensie, coloana dorsală în flexie (cifoză) iar membrele anterioare flectate pe torace.

- Inocularea intracerebrală a şoarecilor permite de asemenea izolarea virusului rabic din suspensiile de ţesut nervos de la animalele suspecte. După o perioadă de incubaţie variabilă, animalul prezintă paralizii care se generalizează. Şoarecii inoculaţi cu virusuri encefalitice (arbovirusuri), virus herpetic prezintă manifestări de encefalită.

Pentru izolări se pot folosi şi alte specii de animale: cobai (pentru izolarea virusului choriomeningitei limfocitare), iepuri inoculaţi prin scarificare corneană (izolarea virusului herpetic).

- Inocularea embrionilor de găină este o metodă uzuală de izolare a virusului urlian (inoculare intraamniotică) sau a virusului herpetic (inoculare pe membrana chorioalantoidiană) şi uneori a unor togavirusuri (inoculare intravitelină).

35.2.2.2.2. <u>Identificarea virusului</u> izolat se realizează cu ajutorul reacţiilor serologice, RFC, RIH, reacţie de neutralizare, cu seruri imune cunoscute.

- RFC este utilă în identificarea arbovirusurilor, virusului herpetic, a virusului rubeolic.

- RIH este aplicabilă în identificarea virusurilor hemaglutinante (arbovirusuri) diferenţiind grupe importante de virusuri.

- Reacţia de neutralizare permite identificarea serotipurilor de virus în culturi de celule pe plăci din material plastic cu godeuri.

35.2.3. Serodiagnosticul neurovirozelor

Se bazează pe aceleaşi reacţii serologice (RFC, RIH şi reacţia de neutralizare) executate pe probele de ser recoltate de la pacient şi cu „o baterie de antigene" ale virusurilor incriminate în sindromul investigat.

- RFC este în general specifică familiei de virus (virusul herpetic, al choriomeningitei limfocitare), dar în infecţiile cu enterovirus (Poliovirus, Coxsackie, ECHO) prezintă specificitate de serotip ca şi reacţia de neutralizare.

- RIH este aplicată curent în serodiagnosticul neurovirozelor (infecţii cu arbovirusuri în care are o reactivitate mai largă decît RFC).

- Reacţia de neutralizare este utilă în serodiagnostic atunci cînd virusul a fost izolat de la bolnav. Criteriul de diagnostic este creşterea semnificativă a titrului anticorpilor (o diferenţă între serul acut şi cel tardiv de cel puţin 1,7 $\log_{10}$). Anticorpii neutralizanţi persistă în organism ani de zile conferind, de cele mai multe ori, protecţie la reinfecţie.

36. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL VIROZELOR RESPIRATORII

VALERIA V. MOROSANU

36.1. Consideraţii generale

In cadrul patologiei infecţioase actuale, infecţiile acute ale tractusului respirator, de etiologie virală şi/sau bacteriană, ocupă o pondere deosebită. Infecţiile acute virale (virozele respiratorii) constituie, practic, o „plagă" a lumii moderne. Numeroşi factori concură la susţinerea acestei opinii:

- multitudinea agenţilor cauzali, fiecare cu numeroase tipuri antigenice distincte;
- absenţa măsurilor profilactice specifice (cu excepţia gripei);
- variaţia antigenică a unor virusuri (de exemplu, virusurile gripale);
- morbiditatea ridicată: se estimează că virozele respiratorii reprezintă între 3o% (pentru adulţi) şi 8o% (pentru copii) din bolile îngrijite de medic în teren.

Un rol deosebit în patologia tractusului respirator îl ocupă virusul gripal, agentul etiologic al gripei. Virusul gripal de tip A realizează periodic (la lo-12 ani) izbucniri epidemice şi pandemice de gripă ca urmare a variaţiilor antigenice majore ale hemaglutininei (Ho,H1,H2,H3) şi uneori ale neuraminidazei (N1,N2) Inlocuirea structurii antigenice vechi cu una nouă sau revenirea la o formulă antigenică veche face ca populaţia să rămînă „descoperită" imunologic, fapt ce explică apariţia epidemiilor şi pandemiilor de gripă. Tipul B este mai puţin supus variaţiilor antigenice. Gripa, principala virază respiratorie, este o importantă problemă de sănătate publică care a obligat punerea la punct a metodelor de diagnostic etiologic şi a măsurilor de profilaxie specifică.

Celelalte principale virusuri implicate în infecţiile acute ale aparatului respirator la om sînt prezentate în tabelul 36.1.

In funcţie de principalele localizări ale virusurilor menţionate, manifestarea clinică a infecţiei are particularităţi clinice proprii care merg de la forme uşoare de guturai şi catare

Tabelul 36-1

Frecvenţa implicării unor microbi în infecţii acute ale tractusului respirator (după Tyrell, 1980, 1967; Fransen, 1970)

Microbi implicaţi	Serotipuri implicate	Sindroame clinice considerate			
		Infecţii respirat. superioare (gutural, faringite)	Crup (laringo-traheo-bronşită)	Bronşiolită	Pneumonie atipică primară
Rhinovirusuri	>100	+++			
Coronavirusuri	3	++			
Virusuri paragripale	1-3	+	++	+	++
	4	±			
Virus respirator sincitial	-	+	+	++ [1]	++
Virus gripal	A,B	In cursul izbucnirilor epidemice devine cauza majoră de infecţii respiratorii			
Adenovirusuri	1,2,5,6	++			
	3,4,7,(14-21)	++	+ [2]	+ [2]	+ [2]
Virusul Herpes simplex	1	+			
Virusuri Coxsackie	$A_{21,24}$; B_{2-5}	++			
Virusuri ECHO	11,20 ş.a.	+			
Virusul Epstein Bar		+			
Streptococcus pyogenes	56	++			
Mycoplasma pneumoniae		+	+	+	++
Coxiella burneti					+
Chlamydia psittaci					+
Corynebacterium diphtheriae		±	±		

[1] La sugari numai. [2] La copilul mic.

benigne la forme grave de bronşiolită şi pneumonii (tabelul 36-1).

Metodele bacteriologice de investigare a infecţiilor acute ale tractusului respirator au fost tratate anterior (→25., 26.) Dacă implicarea bacteriană nu a putut fi demonstrată sau a fost exclusă, laboratorul recurge, în funcţie de posibilităţi, la metode virologice şi serologice de diagnostic.

36.2. Diagnosticul virologic urmăreşte evidenţierea, izolarea şi identificarea virusurilor din produse patologice care variază cu localizarea infecţiei: secreţii nasale, exsudat nasofaringian şi faringian (cel mai frecvent), spută.

36.2.1. Metode rapide de diagnostic evidenţiază virusul infectant direct în produsul patologic:

- coloraţia imunofluorescentă poate depista în celulele descuamate din epiteliul respirator virusurile gripal, respirator sincitial, paragripale, enterovirusuri ş.a.;

- imunoelectronomicroscopia poate diferenţia virusurile respiratorii din familia Orthomyxoviridae (virusurile gripale) şi Paramyxoviridae (virusurile paragripale, virusul respirator sincitial).

36.2.2. Izolarea şi identificarea virusurilor respiratorii din produsele patologice.

36.2.2.1. Izolarea virusului infectant se realizează prin inocularea produselor patologice la gazde de laborator:

- Culturi de celule, în special celule renale de maimuţă, culturi de celule diploide (Wi-38) şi uneori liniile de celule (HeLa, KB). Multiplicarea virusurilor respiratorii în culturi de celule se traduce prin:

. apariţia efectului citopatic (formarea de sincitii gigante în cazul virusului respirator sincitial, apariţia de incluzii virale bazofile intranucleare în cazul adenovirusurilor, apariţia de incluzii acidofile citoplasmatice în cazul virusurilor gripale şi paragripale);

. reacţie de hemaglutinare pozitivă cu mediul supernatant al culturilor de celule infectate (virusurile gripale, adenovirusuri) sau reacţie de hemadsorbţie (virusurile paragripale).

- Culturi de organe, trahee, embrion uman, cornete nasale, sînt utilizate pentru izolarea coronavirusurilor şi rhinovirusurilor. Multiplicarea virală se traduce prin imobilizarea şi necroza cililor epiteliului cilindric.

- Embrioni de găină sînt utilizaţi pentru izolarea virusurilor gripale şi paragripale alegînd inocularea pe cale intraamniotică. Multiplicarea virusului este depistată printr-o reacţie de hemaglutinare pozitivă cu lichidul amniotic infectat şi hematii de om grup O sau de cobai.

36.2.2.2. Identificarea virusului izolat se realizează cu ajutorul reacţiilor serologice (RIH, RFC, reacţia de neutralizare) în prezenţa de seruri imune de referinţă.

RFC identifică, în funcţie de specificitatea antigenului fixator de complement, grupul antigenic de virus (adenovirus, virus respirator sinciţial) sau tipul antigenic (virusuri gripale, paragripale).

RIH identifică virusurile hemaglutinante stabilind tipul antigenic (virusurile paragripale) sau diferenţiind chiar variantele antigenice virale (virusurile gripale) ori individualizînd tulpini (virusurile gripale).

Reacţia de neutralizare este utilă pentru identificarea virusurilor care aparţin genurilor cu numeroase tipuri antigenice (de exemplu, rhinovirusurile).

36.3. Serodiagnosticul infecţiilor acute respiratorii dispune de două metode: RFC şi RIH. Microbul infectant este depistat prin evidenţierea unei dinamici a anticorpilor (reacţii cu seruri perechi) faţă de unul din antigenele introduse în reacţie.

RFC este metoda folosită preferenţial permiţînd stabilirea diagnosticului de infecţie recentă şi folosirea unei „baterii de antigene" care realizează diagnosticul diferenţial al sindromului investigat. Bateria de antigene utilizată este alcătuită din antigenele fixatoare de complement ale virusurilor implicate în mod curent ca agenţi etiologici ai virozelor respiratorii şi este completată cu antigene ale bacteriilor incriminate în etiologia infecţiilor respiratorii acute. Laboratoarele noastre dispun în prezent, pentru serodiagnosticul infecţiilor respiratorii acute, de următoarele antigene fixatoare de complement: gripal A, B, paragripal tip III, virus respirator sinciţial, adenoviral, Coxiella burneti, Chlamydia psittaci, Mycoplasma pneumoniae.

RFC poate fi semnificativă şi pe probă unică de ser utilizînd tratarea cu 2-mercaptoetanol: reducerea sau anularea titrului anticorpilor în proba de ser tratată cu 2-mercaptoetanol, comparativ cu proba martor, demonstrează că anticorpii implicaţi

sînt IgM, deci au apărut în cursul infecţiei virale actuale.

RIH este utilizată în mod practic în:

- serodiagnosticul gripei stabilind subtipul (Ho,H1,H2,H3) sau varianta antigenică circulantă (necesar pentru prepararea de vaccinuri);

- stabilirea amprentelor imunologice determinate de infecţii respiratorii anteriare (gripale, paragripale).

BIBLIOGRAFIE

Buiuc D., Duca E. (1978): Posibilităţile laboratorului de microbiologie clinică în investigarea infecţiilor tractusului respirator inferior. Rev.Med.Chir.(Iaşi), 82:353.

Bulla A., Hitze K.L. (1978): Acute respiratory infections a review. Bull.Wld Hlth Org., 56:481.

Cockburn W.C. (1979): The importance of infection of the respiratory tract. J.Infect., 1, suppl.2:3.

Tyrrell D.A.J. (1980): Approches applicables à la lutte contre les maladies respiratoires à virus. Bull.Wld Hlth Org., 58: 713.

x x x Les maladies à virus des voies respiratoires. O.M.S. Série de Rapp. techniques, no 642, Génève 1980.

x x x Détection des antigènes et des anticorps IgM pour le diagnostique rapid des infections virales: Mémorandum O.M.S. Bull.Wld Hlth Org., 1980, 58:417.

37. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL HEPATITELOR VIRALE

VALERIA V. MOROSANU

Hepatitele virale sînt boli specifice omului, caracterizate prin inflamaţia acută sau cronică a ficatului cauzată de virusurile hepatitice.

37.1. Hepatita virală A

Are ca agent etiologic virusul hepatitic A, un virus RNA aparţinînd probabil familiei Picornaviridae, genul Enterovirus; calea predominantă de transmitere este cea fecal-orală.

Diagnosticul etiologic constă în:

- evidenţierea şi identificarea virusului, în extracte de materii fecale, cu ajutorul imunoelectronomicroscopiei sau tehnicii ELISA; nu s-a reuşit izolarea *i n v i t r o* a virusului;
- evidenţierea unei dinamici a titrului anticorpilor faţă de virusul hepatitei A sau stabilirea apartenenţei acestor anticorpi la clasa IgM atestă diagnosticul de infecţie recentă (dat fiind portajul mare al anticorpilor anti-virus hepatitic A la persoane aparent sănătoase în Franţa 75% din populaţia în jurul vîrstei de 4o ani). Reacţiile serologice utilizate: reacţia de fixare a complementului, testul de imunoaderenţă-hemaglutinare.

37.2. Hepatita virală B

Are ca agent etiologic virusul hepatitic B. Acesta este un virus DNA cu o structură particulară care nu se aseamănă cu nici a unui alt virus. Este alcătuit dintr-o structură de suprafaţă (AgHBs) şi o componentă centrală, de miez („core") (AgHBc). Acest ansamblu constituie particula Dane de 42 nm. DNA-ul viral se replică sub controlul unei DNA-polimeraze. Cel mai recent a fost descris în structura virusului hepatitic B AgHBe. Faţă de aceste componente virale apar în organism anticorpi corespondenţi: anti-HBs, anti-HBc şi anti-HBe. Virusul hepatitic B se transmite predominant pe cale parenterală. Nu a fost cultivat încă *i n v i t r o*. Infecţia are un înalt potenţial de cronicizare.

Diagnosticul etiologic constă, practic, în folosirea metodelor de evidenţiere a componentelor antigenice ale virusului hepatitic B şi a anticorpilor corespondenţi în serul sangvin al pacienţilor

cu infecţie acută sau cronică ori în masa populaţiei (de exemplu, donatorii de sînge).

Tehnicile folosite pentru detectarea markerilor virusului hepatitei B pot fi clasate în

(i) tehnici de „primă generaţie", bine standardizate, uşor de executat în toate laboratoarele, dar puţin sensibile: imundubladifuzie, imunoelectroforeza contracurent, reacţia de fixare a complementului;

(ii) tehnici de „a doua generaţie", mai sensibile, dar dificil de executat prin solicitare de reactivi puri: reacţia de hemaglutinare pasivă şi reacţia de hemaglutinare pasivă inversă;

(iii) tehnici de „a treia generaţie":

- tehnici imunoenzimologice (ELISA) utilizate în special pentru depistarea AgHBs şi anticorpilor anti-HBs,
- tehnici radioimunologice rezervate în special detectării Ag-HBc, Ag-HBe şi anticorpilor anti-HBc şi anti-HBe.

Sînt de amintit şi tehnicile de „a treia generaţie" utilizate pentru decelarea componentelor antigenice ale virusului hepatitei B şi complexelor imune atît în ser cît şi în hepatocit: microscopia electronică, imunoelectronomicroscopia, imunofluorescenţa, activitatea DNA-polimerazică (Ag-HBe).

In fig.37-1 este prezentată evoluţia markerilor serici ai virusului hepatitei B la un pacient cu hepatită acută, iar în tabelul 37-1 este prezentată semnificaţia depistării unui marker al virusului hepatitei B.

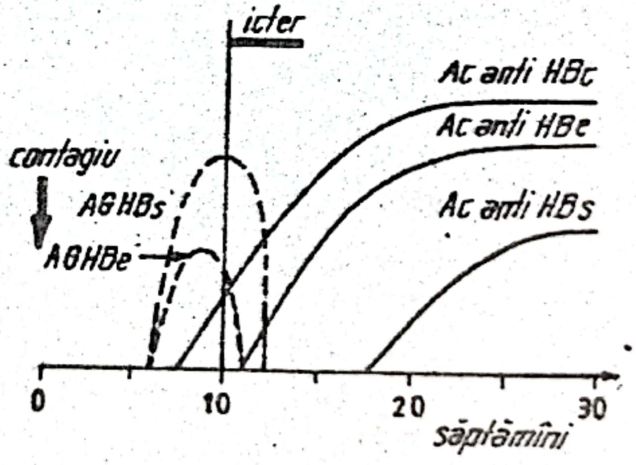


Fig.37-1 Evoluţia markerilor serici ai virusului hepatitei B la un pacient cu hepatită acută (după Degos, 1981)

In hepatita virală cronică, pentru înţelegerea patogeniei, dirijarea terapiei şi aprecierea pronosticului bolnavului, acest diagnostic etiologic este completat cu investigarea imunopatologică: depistarea şi dozarea de autoanticorpi, studiul

Tabelul 37-1

Semnificaţia detectării unui marker al virusului hepatitei B (după Degos, 1981)

Ag-HBs	Ac anti-HBs	Ac anti-HBc	Semnificaţia
+	-	+	Hepatită după 3 săptămîni de la debut Purtător cronic de virus
-	+	+	Antecedente de hepatită B Inoculare de imunoglobuline anti-HBs Transfuzie de anticorpi anti-HBs
-	+	-	Antecedente îndepărtate de hepatită B
-	-	+	Convalescenţa precoce după hepatită B Purtător cronic de Ag-HBs la titru redus Antecedente îndepărtate de hepatită B

sistemului complement, evidenţierea de complexe imune, stabilirea profilului proteic.

BIBLIOGRAFIE

Degos F. (1981): Virus de l'hépatite B. Signification de ses marqueurs et perspectives de la vaccination. Rev.Prat. 31: 2451.

Vyas G.N., Cohen S.N., Schmid R. (1978): Viral hepatitis, The Franklin institute Press, Philadelphia.

Scanned with OKEN Scanner

A N E X A I

TABELE REZUMATIVE

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR IN DIVERSE INFECTII
(exclusiv cele tratate în capitolele 29.-37.)

DUMITRU T. BUIUC

A. Recoltarea şi transportul probelor

B. Examene de laborator indicate pentru demonstrarea etiologiei

- Antrax
- Bruceloză
- Tusea convulsivă şi sindromul de tuse convulsivă
- Rickettsioze
  - tifos exantematic şi murin
  - febre pătate
  - tifos de lăstăriş
  - febra Q
- Chlamidioze
  - trahom
  - conjunctivită cu incluzii uretrită, cervicită
  - limfogranulomatoza inghinală benignă
- Pneumonia atipică primară (sindrom)

Scanned with OKEN Scanner

A. Recoltarea şi transportul probelor

Boala	Probe recomandate	Transport la laborator
Antrax	• Hemoculturi	Imediat
	In funcţie de forma clinică:	
	• Exsudat din pustulă	≤1 oră; la 4°C până la cîteva ore
	• Spută	4°C, interval necritic
	• Fecale	Imediat la 37°C
	• L.C.R.	
Bruceloză:		
- infecţia acută	• Hemoculturi repetate (cîteva zile consecutiv)	Imediat
	• Medulocultură	Imediat
	• Ser	→7.4.2.
	In funcţie de semne şi simptome:	
	• L.C.R.	Imediat la 37°C
	• Bilă B	Imediat la 0-4°C
	• Puroi	≤1 oră; la 4°C până la cîteva ore
	• Urină	
- infecţia subacută/ cronică	• Hemoculturi repetate	Imediat
	• Ser	→7.4.2.
- infecţia latentă	• Ser	→7.4.2.
Tuse convulsivă şi sindrom de tuse convulsivă	• Tampon nasofaringian	Imediat
	• Tampon laringian	Imediat
	• „Placă de tuse"	Imediat
	• Ser I: pînă în ziua 7-a	→7.4.2.
	• Ser II: după ziua 21-a	
Rickettsioze: tifos exantematic şi murin, febre pătate, tifos de lăstăriş	• Sînge integral heparinat (pînă în ziua a 6-a de boală)	Imediat sau inoculat la patul bolnavului
	• Sediment globular sau cheagul sanguin (după a 7-a zi de boală)	Imediat
	Post mortem:	
	• Splină, ficat	Imediat
	• Artropode	Imediat (de evitat inaniţia şi refrigerarea)
	• Ser.I: pînă în ziua 1o-a	→7.4.2.
	• Ser II: după ziua 21-a	

(continuare pe pagina următoare)

A. Recoltarea şi transportul probelor

Boala	Probe recomandate	Transport la laborator
Febra Q	• Sînge integral heparinat (în stadiul febril precoce)	Refrigerat la 4°C; interval necritic: ore-zile
	Post mortem:	
	• Pulmon, splină, ficat	
	• Ser I: pînă în ziua 1o-a • Ser II: după ziua 21-a	→7.4.2.
Trahom (stadiul acut)	• Raclat foliculi conjunctivali (partea superioară a conjunctivei tarsiene) - recomandat pentru examen microscopic	Frotiu extemporaneu; uscat în aer poate fi examinat după maximum cîteva ore
	• Tampon conjunctival - recomandat pentru izolare	Mediu de transport[1] la 4°C în cîteva ore
	• Ser	→7.4.2.
	• Lacrimi din sacul conjunctival (pe hîrtie de filtru sau bureţi de celuloză 1x1x7 mm)	La 4°C în flacon cu o,2 ml sol.salină izotonă sterilă
Conjuntivită cu incluzii, uretrită, cervicită	• Raclat de la nivelul mucoasei afectate	Frotiu extemporaneu; mediu de transport[1] la 4°C în cîteva ore
	• Ser	→7.4.2.
Limfogranulomatoză inghinală benignă	• Puroi din bubon punctionat	Congelat
	• Puroi din bubon fistulizat	Congelat
	• Biopsie ganglionară	- Un fragment congelat; - Un fragment în fixator pentru examen histopatologic
	• Ser I: pînă în ziua 1o-a • Ser II: după ziua 21-28-a	→7.4.2.
Pneumonie atipică primară	• Spută în primele zile	Congelat
	• Spălătură faringiană	Congelat
	• Ser I: pînă în ziua 7-a • Ser II: după ziua 14-a	→7.4.2.

1) Soluţie de zaharoză-fosfat-glutamat adiţionată cu streptomicină, vancomicină (lincomicină) şi un antibiotic antifungic. Alternativ, poate fi folosit orice mediu de întreţinere pentru culturi celulare adiţionat cu ser fetal de vacă.

A. Recoltarea şi transportul probelor

Boala	Probe recomandate	Transport la laborator
Febra Q	• Sînge integral heparinat (în stadiul febril precoce) Post mortem: • Pulmon, splină, ficat • Ser I: pînă în ziua 1o-a • Ser II: după ziua 21-a	Refrigerat la 4°C; interval necritic: ore-zile →7.4.2.
Trahom (stadiul acut)	• Raclat foliculi conjunctivali (partea superioară a conjunctivei tarsiene) - recomandat pentru examen microscopic • Tampon conjunctival - recomandat pentru izolare • Ser • Lacrimi din sacul conjunctival (pe hîrtie de filtru sau bureţi de celuloză 1x1x7 mm)	Frotiu extemporaneu; uscat în aer poate fi examinat după maximum cîteva ore Mediu de transport[1] la 4°C în cîteva ore →7.4.2. La 4°C în flacon cu o,2 ml sol.salină izotonă sterilă
Conjuntivită cu incluzii, uretrită, cervicită	• Raclat de la nivelul mucoasei afectate • Ser	Frotiu extemporaneu; mediu de transport[1] la 4°C în cîteva ore →7.4.2.
Limfogranulomatoză inghinală benignă	• Puroi din bubon puncţionat • Puroi din bubon fistulizat • Biopsie ganglionară • Ser I: pînă în ziua 1o-a • Ser II: după ziua 21-28-a	Congelat Congelat - Un fragment congelat; - Un fragment în fixator pentru examen histopatologic →7.4.2.
Pneumonie atipică primară	• Spută în primele zile • Spălătură faringiană • Ser I: pînă în ziua 7-a • Ser II: după ziua 14-a	Congelat Congelat →7.4.2.

1) Soluţie de zaharoză-fosfat-glutamat adiţionată cu streptomicină, vancomicină (lincomicină) şi un antibiotic antifungic. Alternativ, poate fi folosit orice mediu de întreţinere pentru culturi celulare adiţionat cu ser fetal de vacă.

B. Examene de laborator indicate pentru demonstrarea etiologiei

Boala	Examen microbiologic			Examenul serologic
	Examen direct microscopic	Izolarea	Identificarea	
Antrax	Pozitiv în stadiul de pustulă; indicată colorația cu albastru de metilen Loeffler vechi	Agar nutritiv, agar-sînge Aerob Din fecale: pe baza termorezistenței sporilor	Caractere microscopice (prezența capsulei) și de cultură Sensibilitatea la penicilină Patogenitatea ptr. șoarece. → 15.1.	
Bruceloză	Negativ în preparate uzuale; colorația imunfluorescentă poate fi utilă	Bulion sau agar infuzie de ficat Aerob și aerob+CO_2	Necesitatea CO_2 Producerea H_2S[2] Sensibilitatea la coloranți Antigenic → 13.3.	- In infecția acută: • r.Wright (aglutinare) cu marcant fenomen de prozonă; anticorpi IgM și IgG - In infecția subacută/cronică sau latentă: • RFC • r.Coombs ptr. depistarea anticorpilor IgG blocanți
Tusea convulsivă și sindromul de tuse convulsivă	Colorația imunfluorescentă este utilă	Mediu Bordet-Gengou selectiv prin adiție de o,25-o,5 UI penicilină/ml Aerob	Caractere microscopice și de cultură Antigenic → 13.2.	• r.de aglutinare[1)2)] • RFC[3)]

1) Bateria de antigene trebuie să includă suspensia de B.pertussis și B.parapertussis.

2) Procentajul examenelor pozitive este mai mare decît în diagnosticul bacteriologic.

3) Bateria de antigene trebuie să includă în afara antigenelor Bordetella și cele adenoviral, virus respirator sincițial, paragripal ș.a. (→ 36.3.)

Scanned with OKEN Scanner

B. Examene de laborator indicate pentru demonstrarea etiologiei (continuare)

Boala	Examenul microbiologic			Examenul serologic
	Examen direct microscopic	Izolarea	Identificarea	
Rickettsioze: tifos exantematic şi murin, febre pătate tifos de lăstăriş		Inoculare intraperitoneală la doi cobai mas-culi[1)2)3)] (metoda re-comandată) Inoculare în sacul vite-lin al embrionului de găină	Patogenitatea ptr. animal Antigenic[4)]	- Reacţii cu antigen Proteus: • r. Weil-Felix[5)6)] - Reacţii cu antigene rickettsiene: • RFC (specifică de grup) • r.de aglutinare (specifică de specie) • r.de hemaglutinare pasivă[7)]
Febra Q		Inoculare intraperitoneală la cobai Inoculare în sacul vite-lin al embrionului de găină	Patogenitatea ptr. animal Antigenic[4)]	• RFC (⟶ 36.3.) • r.de aglutinare

1) Izolarea şi identificarea rickettsiilor sînt rezervate laboratoarelor de referinţă. Examenul serologic este accesibil laboratoarelor clinice, ca atare metoda uzuală de diagnostic.

2) Sîngele se inoculează ca atare, cheagul după mojarare şi suspensionare în bulion steril; artropodele după decontaminare în băi succesive de eter şi apă distilată.

3) Rezultate superioare faţă de inocularea în oul embrionat.

4) Antigen preparat din sacul vitelin infectat; se testează în RFC, r.de aglutinare sau neutralizare cu seruri de referinţă. Cobaii supravieţuitori infecţiei experimentale sînt examinaţi serologic cu antigene de referinţă.

5) r.de aglutinare cu antigene: Proteus OX19 în tifosul exantematic şi murin şi în febrele pătate; Proteus OX2 în febrele pătate; Proteus OXK în tifosul de lăstăriş.

6) Reacţia Weil-Felix este negativă în rickettsiozele de recidivă (boala Brill-Zinsser ş.a.)

7) Decelează anticorpii din ziua a 4-a de boală şi se negativează după cca 3 luni. De aceea r.de hemaglutinare pasivă este indicată la pacienţi cu RFC şi r.de aglutinare pozitive (anticorpi persistenţi) ptr. a diferenţia rickettsioza actuală de reacţii anamnestice la un fost bolnav.

Scanned with OKEN Scanner

B. Examene de laborator indicate pentru demonstrarea etiologiei (continuare)

Boala	Examenul microbiologic			Examenul serologic
	Examen direct microscopic	Izolarea	Identificarea	
Chlamydioze:				
trahom conjunctivita cu incluzii uretrită cervicită	Depistarea de corpi elementari şi incluzii în citoplasma celulelor parazitate prin: • coloraţie cu iod[1)] • coloraţie Giemsa[2)] • coloraţie imunfluorescentă[3)]	Inoculare în sacul vitelin al embrionului de găină	Caracterul microscopic al incluziilor: dense, rigide, iodofile, destind celula şi deplasează nucleul Sensibilitatea la sulfadiazină (1 mg/ embrion) Antigenic	•RFC (specifică de grup; accesibilă; nerecomandată) •r.de imunfluorescenţă (sensibilă, specifică; mai greu accesibilă; recomandată)
limfogranulomatoza inghinală benignă	Depistarea incluziilor caracteristice pe frotiuri din puroi, amprente de ganglioni colorate Giemsa	Inoculare în sacul vitelin al embrionului de găină Inoculare intracerebrală la şoarece	Caracterul microscopic al incluziilor Sensibilitatea la sulfadiazină (1 mg/ embrion) Antigenic	•RFC (specifică de grup) •i.d.r. Frei[4)]

1) Cea mai rapidă şi ieftină; puţin sensibilă; indicată ptr. triaj de masă în teren: fixare cu metanol absolut, colorare 3-5 minute cu sol.Lugol sau sol.5% iod în iodură de potasiu 10% (g/v) Examen în montaj umed cu obiectiv 40x. Incluziile iodofile apar ca mase brun-roşcate.

2) Metoda general recomandată: frotiul fixat cu metanol absolut se acoperă timp de 1 oră cu colorant Giemsa diluat (1 parte sol.Giemsa mamă + 40-50 părţi apă distilată tamponată la pH 7,2); spălare cu etanol 95° ptr. a elimina excesul de colorant; examinare cu imersia. Corpii elementari apar coloraţi roşu violet cu Ø de cca 300 nm, iar corpii iniţiali coloraţi albastru sau violet cu Ø de cca 1-1,5 µm.

3) Cea mai sensibilă, indicată la pacienţi cu trahom benign sau care au depăşit stadiul acut; rezervată laboratoarelor dotate.

4) Sensibilizare de tip întîrziat depistată prin i.d.r. cu puroi tyndallizat aspirat din bubonul nefistulizat sau cu suspensie tyndallizată de sac vitelin infectat cu C.trachomatis (în acest caz este necesară şi inocularea, la antebraţul opus, a unui antigen martor preparat din sac vitelin normal.

B. Examene de laborator indicate pentru demonstrarea etiologiei (*continuare*)

Boala	Examenul microbiologic			Examenul serologic
	Examen direct microscopic	Izolarea	Identificarea	
Pneumonie atipică primară		Medii speciale ptr. Mycoplasma[1] Inoculare în sacul vitelin al embrionului de găină sau intranasal la şoarece[1)2)] ptr. Chlamydia psittaci	Mycoplasma pneumoniae: pe baza caracterelor de cultură, biochimice hemadsorbţie-hemaglutinare Antigenie Chlamydia psittaci: caracterul microscopic al incluziilor (difuze fără matriţă iodofilă) Rezistenţa la sulfadiazină (1mg/embrion) Antigenie	• RFC cu baterie de antigene (→ 36.3.) ptr. infecţia cu M.pneumoniae (în absenţa antigenului specific): • aglutinarea streptococului MG[3)4)] • hemaglutinine la rece[4)5)]

1) Izolarea şi identificarea mycoplasmelor şi a chlamydiilor sînt de competenţa unor laboratoare special dotate.

2) Pentru a izola C.psittaci, probele contaminate se inoculează după tratare cu streptomicină sau kanamicină.

3) Streptococ MG, denumire uzuală pentru tulpinile alfa şi gama-hemolitice de S.anginosus.

4) Aglutininele anti MG şi hemaglutininele la rece trebuie dozate în paralel fiind anticorpi diferiţi. Cele două teste împreună pot depista pînă la 50-75% din pacienţii infectaţi cu M.pneumoniae.

5) Hemaglutininele la rece sînt autoanticorpi care aglutinează la 4°C propriile hematii (autoaglutinare) sau pe cele de grup O (izoaglutinare).

A N E X A II

PREPARAREA SOLUTIILOR DE COLORANTI SI A REACTIVILOR NECESARI COLORARII BACTERIILOR

Prepararea soluţiilor alcoolice saturate ale coloranţilor bazici

Colorant (albastru de metilen, violet de genţiană, fucsină bazică ş.a.)	1o g
Alcool etilic 96°	1oo ml

Se mojarează colorantul, se adaugă o parte din alcool şi se continuă mojararea. Se transvazează într-un flacon cu dop rodat. Restul de alcool se adaugă treptat, în porţiuni mici, pentru a spăla colorantul din mojar, fiecare porţiune transvazîndu-se apoi în flacon. Se menţine flaconul la 37°C timp de 7 zile cu agitare la intervale. Se filtrează prin hîrtie. Filtratul reprezintă soluţia alcoolică saturată a colorantului.

Prepararea soluţiei de albastru de metilen Löffler

Soluţie alcoolică saturată de albastru de metilen	3o ml
Soluţie 1% KOH	1 ml
Apă distilată	1oo ml

Se foloseşte pentru coloraţii simple sau pentru recolorare în coloraţia Ziehl-Neelsen.

Prepararea soluţiilor de albastru policrom. Aceste soluţii se obţin fie prin (i) „învechirea" soluţiei de albastru de metilen Löffler, fie prin (ii) utilizarea boraxului.

(i) Soluţia de albastru de metilen Löffler „vechi". Soluţia de albastru de metilen Löffler se păstrează minimum 12 luni în flacoane semiînchise cu agitare la intervale pentru a asigura o bună aerare a conţinutului. Prin oxidare lentă, albastru de metilen formează un compus violet cu proprietăţi policrome.

(ii) Soluţia de albastru Masson

Albastru de metilen	2o g
Borat de sodiu (borax)	5o g
Apă distilată	1ooo ml

Intr-un balon de sticlă incoloră se încălzeşte pînă la solvi-

rea completă amestecul de borax şi apă. In soluţia de borax caldă se solvă albastrul de metilen. Se menţine 2-4 zile la termostat la 37°C şi 6-8 zile pe masă, la lumină, cu agitare la intervale.

Soluţiile de albastru policrom se pot folosi în aceleaşi scopuri ca şi soluţia de albastru de metilen Löffler. Sînt indicate pentru evidenţierea capsulei şi materialului capsular al B.anthracis în frotiuri din sînge la animale (în infecţia naturală şi experimentală).

Prepararea soluţiei de violet de metil

Violet de metil	o,2	g
Apă distilată	loo	ml

Se filtrează prin hîrtie.

Se foloseşte în coloraţia Gram. Pentru coloraţia Gram se mai pot folosi, cu rezultate mai puţin bune, şi violet de genţiana sau cristal violet.

Prepararea soluţiei de fucsină fenicată Ziehl

Soluţie alcoolică saturată de fucsină bazică	lo ml
Soluţie 5% fenol în apă distilată	1oo ml

Se filtrează prin hîrtie.

Se foloseşte în coloraţia Ziehl-Neelsen. Această soluţie diluată 1/lo cu apă distilată se foloseşte pentru recolorare în coloraţia Gram.

Prepararea soluţiei Lugol

Iod sublimat	1	g
Iodură de potasiu	2	g
Apă distilată	2oo	ml

Se solvă iodura de potasiu în cca 2o ml apă, se adaugă şi se solvă iodul, apoi se adaugă restul de apă.

Se foloseşte ca mordant în coloraţia Gram şi pentru colorarea incluziilor trahomatoase. In acest ultim scop este utilizată şi soluţia 5% iod în soluţie lo% iodură de potasiu (g/v), preparată în acelaşi mod ca şi soluţia Lugol.

Scanned with OKEN Scanner

Prepararea amestecului decolorant alcool-acetonă

Alcool etilic 96°	3 volume
Acetonă	1 volum

Se foloseşte pentru diferenţiere în coloraţia Gram.

Prepararea soluţiei decolorante de alcool clorhidric

Acid clorhidric concentrat (35%)	3 ml
Alcool etilic 70°	97 ml

Se foloseşte pentru diferenţiere în coloraţia Ziehl-Neelsen.

GH ASACHI
IAŞI

Scanned with OKEN Scanner